

Frankfurt a/M

**ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DER
GLUTAMINSYNTHEASE**

Annelore Dahlinger

1961

ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DER GLUTAMINSYNTHEASE

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe - Universität
Frankfurt am Main

eingereicht von
Annelore Dahlinger
aus Leipzig
1962

1. Berichterstatter: Prof.Dr.Pfleiderer
2. Berichterstatter: Prof.Dr.Halbsguth



Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Frankfurt am Main.

Tag der mündlichen Prüfung : 24. Juli 1962

Tag der Promotion : 30. Juli 1962

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	<u>Seite</u>
A. Die zentrale Bedeutung von Adenosintriphosphat bei biologischen Synthesen	1
I. Spaltung des ATP in AMP und Pyrophosphat ..	2
II. Spaltung des ATP in ADP und Phosphat	6
1. Die enzymatische Glutaminbildung	9
B. I. 1. Darstellung und Reinigung der Glutaminsynthetase	18
a) Bestimmung der Aktivität der Glutaminsynthetase	18
b) Isolierung der Glutaminsynthetase ...	20
a) Fraktionierte Ammonsulfatfällung .	21
b) Adsorption an Calciumphosphatgel .	22
c) Säulenchromatographie mit CM-Zellulose	25
2. 2 neue Mikrobestimmungsmethoden	
a) Mikromethode zur Bestimmung von Proteinen	28
b) Mikromethode zur Bestimmung von Ammoniak	29
3. Quantitative Entfernung von Ammoniumionen	
a) aus Glutaminsynthetase	31
b) aus Milchsäuredehydrogenase und Pyruvatkinase	33
4. Einige Eigenschaften der Glutaminsynthetase	34
II. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Glutaminsynthetase	36
1. Die Zündreaktion	36
2. Die Enzym-ATP-Verbindung	41
3. Die "aktivierte Glutaminsäure"	45
4. Die Glutaminbildung	49
III. Diskussion	50

C. Experimenteller Teil

I. Der optische Test zur Bestimmung der Aktivität der Glutaminsynthetase	53
II. Isolierung der Glutaminsynthetase	54
III. Mikromethode zur Bestimmung von Proteinen	59
IV. Mikromethode zur Bestimmung von Ammoniak	59
V. Quantitative Entfernung von Ammoniumionen	60
VI. Verdauung der Glutaminsynthetase mit RNase	61
VII. Hochspannungselektrophorese	62
VIII. Darstellung von radioaktiv-markiertem ATP ³² ----	
1. α -markiertes ATP ³²	63
2. β -markiertes ATP ³²	64
3. γ -markiertes ATP ³²	65
IX. Messung der Radioaktivität	65
X. Messung des während der Zündreaktion gebildeten ADP durch den optischen Test.	66
XI. Nachweis der E-ATP-Verbindung mit radioaktivem ATP ³²	72
XII. Bestimmung von K _{II}	73
XIII. Isolierung der "aktivierten Glutaminsäure"	74
D. Zusammenfassung	75
E. Literaturverzeichnis	77

Einführung

A. Die zentrale Bedeutung von Adenosintriphosphat bei biologischen Synthesen.

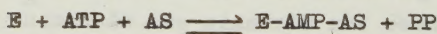
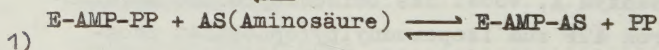
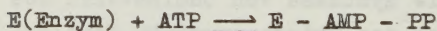
Für lebende Zellen ist es charakteristisch, daß sie die chemische Energie der Nahrungsstoffe in andere Energieformen - Elektrizität, Bewegung, Licht, osmotische Arbeit, neue chemische Bindungen - umwandeln können. Jedoch muß diese chemische Energie, die in Kohlenhydraten, Fetten oder Eiweißen enthalten ist, in eine bestimmte Form von chemischer Bindungsenergie verwandelt werden, ehe sie ausgenutzt werden kann. Das ist die Energie, die in den Pyrophosphatbindungen des Adenosintriphosphats (ATP) lagert und bei deren hydrolytischer Spaltung frei wird. Gegen Ende der zwanziger Jahre wurde ATP von Meyerhof und Lohmann als Coenzym der Milchsäuregärung im Muskel entdeckt (1). Bis zum Anfang der vierziger Jahre wurde die zentrale Stellung des ATP bei den verschiedensten biologischen Energieumwandlungen besonders durch die Arbeiten von Meyerhof, Kallbach, Ochoa und Lipmann (2) bekannt. Sehr viele biologische Synthesen benötigen als Energiedonator ATP, das die Reaktionen thermodynamisch möglich macht, wie die Proteinbiosynthese, die Synthese von Cholesterin aus Acetyl-Coenzym A, wobei das Zwischenprodukt Mevalonsäure durch ATP zum Isopentenylpyrophosphat phosphoryliert wird, die Synthese von Harnstoff aus CO_2 und NH_3 oder die Synthese von Glutamin aus Glutaminsäure und Ammoniak, um nur einige Beispiele von vielen zu nennen. Genauer gesagt müssen die Reaktionspartner dieser energieverbrauchenden, endergonischen Reaktionen mit einer energieliefernden, exergonischen Reaktion gekoppelt werden, um ablaufen zu können. Sie müssen aktiviert werden. Dabei bilden sich unter Spaltung von ATP energiereiche Verbindungen, die dann mit einem weiteren Reaktionspartner in geeigneter Weise reagieren können. Der Mechanismus dieser

Reaktionen ist noch keineswegs bei allen enzymatischen Vorgängen restlos geklärt.

Die Beteiligung des ATP kann in Synthesen, bei denen es als Energiedonator dient, auf verschiedene Arten erfolgen. Es wird entweder an der Adenosinmonophosphat - Pyrophosphat - Bindung (AMP - PP) oder an der Adenosindisphosphat - Phosphat - Bindung (ADP - P) gespalten. Auch kann es als Bestandteil eingebaut werden.

A.I. Spaltung des ATP in AMP und Pyrophosphat.

Beim Aufbau hochmolekularer Proteine aus einzelnen Aminosäuren besteht der erste Schritt dieser biologischen Proteinsynthese in der Aktivierung einer α -Aminosäure an der Carboxylgruppe. B. Hoagland (3) fand bei Zusatz von α -Aminosäuren zu Leberplasma einen erhöhten Einbau von radioaktiv markiertem Pyrophosphat in ATP. Aus dieser Austauschreaktion ($ATP + P^*P \rightleftharpoons ADP + PP^*$) schloß er auf die Struktur der aktivierten Säure. Sie stellt ein AMP-Acyylanhydrid dar, das fest an das aktivierende Enzym gebunden ist, denn dieses Anhydrid aus Adenylsäure und α -Aminosäure tritt nicht frei auf. Die Reaktion verläuft wie folgt:



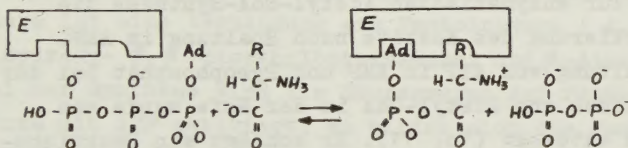
In Extrakten aus Bakterien (4) und aus Hefe (5) konnte diese Reaktion ebenfalls festgestellt werden.

Für das Vorhandensein von aktivierten Aminosäuren konnte Hoagland neben dem ATP - PP - Austausch noch einen zweiten Beweis erbringen. Bei Hinzufügen des stark nucleophilen Hydroxylamins zum Inkubationsansatz von Gleichung 1) reagiert die carboxyl-aktivierte Aminosäure und bildet Hydroxamat, dabei wird das

Enzym regeneriert und eine äquivalente Menge von AMP frei:



Ohne Zugabe von Cytoplasma, das die aktivierenden Enzyme enthält, entsteht keine Hydroxamsäure, d.h. es muß vor der Hydroxamsäurebildung eine Aktivierung der Aminosäure entsprechend Gl.1) stattgefunden haben. In einer späteren Arbeit konnten Hoagland u.a. (6) einen Mechanismus für die Verdrängung der PP-Gruppe am ATP durch die Aminosäure angeben:



- Abb. 1 -

Ein spezifisches, aminosäure-aktivierendes Enzym bindet danach wahrscheinlich den Adeninteil des ATP und einen Teil der Aminosäure unter Spaltung des ATP durch einen Angriff des Carboxylsauerstoffs auf das α-Phosphat des ATP. Dabei wird Pyrophosphat abgespalten. Es entsteht eine enzymgebundene, carboxyl-aktivierte Aminosäure-AMP-Verbindung, die

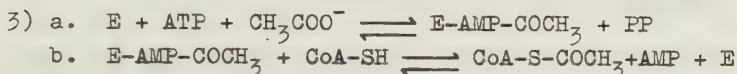
ein Anhydrid darstellt. Der Acceptor für diese aktivierte Aminosäure in der Zelle ist eine im Cytoplasma auftretende lösliche RNS (7), die die Aminosäure in aktiviertem Zustand auf die Ribosomen überträgt, an denen die eigentliche Proteinsynthese nach einem bisher noch unbekannten Mechanismus stattfindet.

Wird die Aminosäure-AMP-Verbindung gespalten, so verbleibt der Sauerstoff der Carboxylgruppe der Aminosäure, der an der Anhydridbindung beteiligt war, am AMP. Das konnte mit Tryptophan, das in der Carboxylgruppe mit ^{18}O markiert war, bewiesen werden (8).

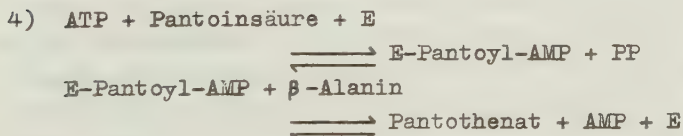
Im AMP war nach Inkubation ein Sauerstoffatom durch ^{18}O ersetzt.

Zum gleichen Ergebnis führten Arbeiten über die Aktivierung von Fettsäuren. Boyer (9) fand bei Versuchen zur enzymatischen Acetyl-CoA-Synthese die ^{18}O -Markierung des Acetats nach Spaltung im AMP. Die Spaltung von ATP in AMP und Pyrophosphat bei der Biosynthese von Acetyl-CoA in der Hefe wurde von Lipmann entdeckt (10, 11). Er schlägt ein Reaktionsschema vor, bei dem Hefeenzym mit ATP unter Bildung einer Enzym-AMP-Verbindung und Pyrophosphat reagiert. Ersteres verbindet sich weiter mit Coenzym-A unter Abspaltung von AMP. Versuche von Berg (12, 13, 14) ergaben aber, daß der erste Schritt nur in Gegenwart von Acetat vor sich geht. Dabei tauscht nämlich das aus Hefe isolierte Enzym den Pyrophosphatanteil des ATP gegen radioaktives Pyrophosphat aus. Es bildet sich ein Anhydrid aus Adenylsäure und Essigsäure. Wie bei der Aktivierung der Aminosäuren bleibt auch hier das Zwischenprodukt mit dem Enzym verknüpft. Es läßt sich nicht isolieren und kann nur mit Hydroxylamin nachgewiesen werden. Es ist also Adenylacetat das energiereiche Zwischenprodukt, das mit Coenzym-A zu Acetyl-CoA und freier Adenylsäure weiterreagiert.

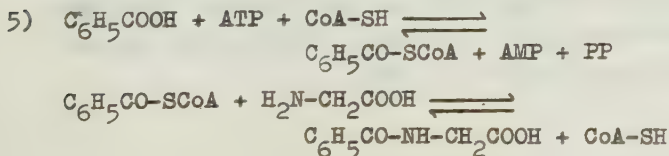
Berg bewies folgenden Mechanismus:



Durch synthetisch gebildetes Adenylacetat, mit dem in Gegenwart des Enzymsystems und ^{32}P - Pyrophosphat die Bildung von radioaktivem ATP zu beobachten war (Rückreaktion von Gl. 3a), konnte dieser Mechanismus bestätigt werden (15). Bei der Aktivierung höherer Fettsäuren ist entsprechend ein Acyl-Adenylat das Zwischenprodukt, welches anschließend durch CoA-SH in Acyl-SCoA und AMP zerlegt wird. (20, 21). An der Fettsäure-CoA-Verbindung können die weiteren Reaktionen vor sich gehen. Für die Biogenese der Pantothenensäure konnten Maas und Novelli (16, 17, 18) einen ähnlichen Mechanismus vorschlagen. Pantothenensäure ist eine Verbindung aus Pantoinsäure (α, γ -Dihydroxy- β, β -dimethylbuttersäure) und β -Alanin. Bei der Synthese wird die Säuregruppe der Pantoinsäure mit ATP aktiviert. Es bildet sich die Pantoyl-AMP-Verbindung und Pyrophosphat. Ersteres kondensiert mit β -Alanin zur Pantothenensäure. Das Enzym wurde aus *Escherischia coli* angereichert:



Es sei in diesem Zusammenhang noch die Hippursäuresynthese erwähnt. Die Benzoyl-Thiokinase aktiviert Benzoat unter gleichzeitiger Spaltung von ATP in AMP und PP, sodaß es mit Glycin zur Bildung der Hippursäure reagieren kann:



Der Mechanismus scheint dem der Acetataktivierung zu gleichen, da Benzoyl-AMP Benzoat und ATP ersetzen kann (19).

Auch bei der Sulfataktivierung liefert ATP die Energie für die Bildung einer Adeninnucleotid-Sulfat-Verbindung (22).

A.II. Spaltung des ATP in ADP und Phosphat.

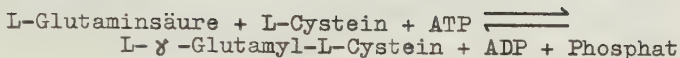
Inkubiert man zur enzymatischen Bildung von Glutamin ein Enzym, ATP, Ammoniak und Glutaminsäure, die in der γ -Carboxylgruppe mit ^{18}O markiert ist, so findet man nach der Synthese den radioaktiven Sauerstoff im abgespaltenen Monophosphat. Boyer und Koshland (23, 24) konnten auch hier eine Anhydridbildung zwischen Glutaminsäure und Phosphorsäure nachweisen, aber es liegt eindeutig ein anderer Mechanismus vor. Es bleibt nicht AMP unter Abspaltung von Pyrophosphat mit der Carboxylgruppe der Aminosäure verbunden, sondern es verbindet sich das γ -Phosphat des ATP mit der γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure unter Abspaltung von ADP. Der genaue Mechanismus wird an anderer Stelle dieser Arbeit besprochen.

Diese zweite Spaltungsmöglichkeit von ATP hat Cohn (25) für die Succinyl-CoA-Synthese postuliert. Für die Rückreaktion, d.h. für die Bildung von ATP aus Succinyl-CoA, ADP und anorganischem Phosphat nimmt man ein S-Phosphoryl-Coenzym-A als Zwischenprodukt an (26).

Auch bei der Acetokinase-Reaktion bildet sich aus Acetat und Phosphat ein Acetylphosphat, wobei ADP abgespalten wird (64, 65).

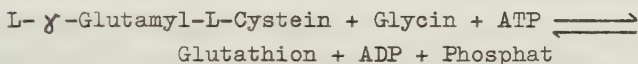
Von Bloch et al. (27, 28) ist die Synthese des Tripeptids Glutathion als Beispiel einer Peptidsynthese untersucht worden. Sie verläuft in zwei ATP-abhängigen Stufen, die durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert werden (29, 30).

6) Stufe I:



Die Verknüpfung der Aminosäuren erfolgt über intermediäre Phosphorsäureverbindungen. Das Enzym dieser Stufe ist die Glutathionsynthetase I. Sie wurde aus Weizenkeimextrakten isoliert und zeigt große Ähnlichkeit mit der Glutaminsynthetase aus Erbsen. Beide können den γ -Glutamylrest mit Cystein verknüpfen (29, 30); außerdem ließen die Versuche auf ein enzymgebundenes γ -Glutamylphosphat als Intermediärprodukt und die mögliche Identität beider Enzyme schließen.

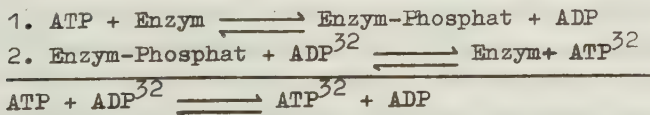
7) Stufe II:



Dieser Schritt wird durch die Glutathionsynthetase II katalysiert. Sie wurde von Webster et al. aus Mitochondrien von Bohnenhypokotylen (31), aus Weizenkeimlingen (32), von Bloch aus Taubenleber (33) und von Snoke aus Hefe (34) isoliert. Von Letzterem konnte sie 5000-fach angereichert werden.

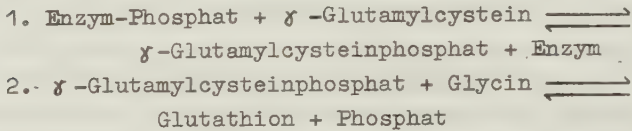
Snoke (35) fand, daß in Abwesenheit des Substrats mit dem Hefeenzym ein Phosphataustausch zwischen ATP und ADP stattfindet, obwohl kein freies Phosphat gebildet wird. Er postuliert daher die Teilnahme eines Enzym-Phosphat-Komplexes an der Reaktion in folgender Weise:

8) Stufe IIa:



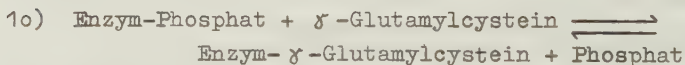
Radioaktiv markiertes anorganisches Phosphat wird in Gegenwart des Substrates nicht in ATP eingebaut. Somit wären die weiteren Schritte der Stufe II mit dem gebildeten Enzymphosphat:

9) Stufe IIb:



Anorganisches Phosphat wird in Gegenwart von Glutathion in ADP unter Bildung von ATP eingebaut. Ein aktiviertes Zwischenprodukt konnte wiederum nicht isoliert, sondern nur mit Hydroxamsäure nachgewiesen werden.

Webster und Varner (30) fanden dagegen mit dem Enzym aus Weizenkeimlingen einen Austausch zwischen radioaktivem Orthophosphat und dem endständigen Phosphat im ATP nur in Anwesenheit von Glutamylcystein, was auf eine Enzym-Glutamyl-Cystein-Verbindung schließen ließ:



Allerdings war die Austauschrate hierbei nur äußerst gering (0,3% im Gegensatz zu 6,8% Synthese von ATP in der Rückreaktion von Gl.9)2.) und könnte auf Spuren Glycin zurück zu führen sein, sodaß doch enzymgebundenes γ -Glutamylcysteinphosphat intermediär gebildet wird.

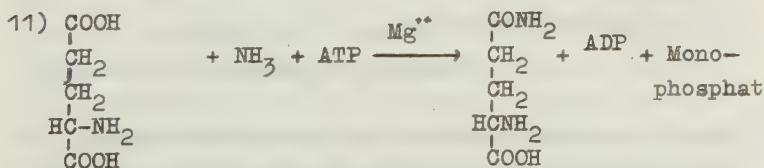
Die Beispiele zeigen, 2 Arten von biologischen Synthesen, an denen ATP als Energiedonator beteiligt ist. Im ersten Fall findet sich der Carboxylsauerstoff nach der Synthese im AMP und im letzteren im abgespaltenen Phosphat. Die beiden anderen Möglich-

keiten - Einbau des Sauerstoffs der Anhydridbrücke in ADP oder Pyrophosphat - sind bis heute noch unbekannt.

A.II. 1. Die enzymatische Glutaminbildung.

Bei der Besprechung der Rolle des ATP wurden kurz einige Probleme der biologischen Proteinsynthese angedeutet. Um Informationen über die Bildung von Peptidbindungen in biologischen Systemen zu erhalten, untersuchte man die Glutaminsynthetase schon seit langem mit besonderem Interesse, weil hier in einem relativ einfachen System eine Amidbindung neu gebildet wird. Da sich Amid- und Peptidbindungen strukturell und energetisch ähneln, nahm man an, daß auch der Mechanismus ihrer Synthese ähnlich sei. Die Glutaminsynthese kann daher als Modell für die Peptidsynthese angesehen werden.

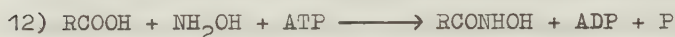
Seit den Arbeiten von K r e b s aus dem Jahr 1935 (36) weiß man, daß Glutamin aus Glutamat und Ammoniak in Gewebsschnitten aus Niere, Gehirn und Retina verschiedener Vertebraten-Species gebildet wird. Er vermutete schon damals, daß ATP der Energiedonator sei. Auch in Extrakten aus Taubenleber, Schafshirn und grünen Erbsen konnte von F. Speck (37, 38) und H. E l l i o t t (39, 40) Glutaminsynthetase nachgewiesen werden. Dieses Enzym katalysiert folgende Reaktion:



Es wird eine Carboxylgruppe, und zwar die γ -Carboxylgruppe der L-Glutaminsäure, aktiviert.

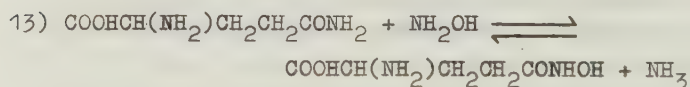
Mg^{++} ist für diese Reaktion notwendig. Es kann durch Mn^{++} ersetzt werden, aber die Reaktionsgeschwindigkeit der Glutaminbildung nimmt dabei um 50% ab (38). In einer Konzentration, die 1/10 der optimalen Konzentration von Mg^{++} beträgt, kann Co^{++} das Mg^{++} vollwertig vertreten (42).

In vitro kann Ammoniak durch Hydroxylamin oder Hydrazin ersetzt werden (38). Cystein reagiert ebenfalls mit Glutaminsäure, aber wesentlich langsamer. Das Produkt ist γ -Glutamyl-Cystein (30). Mit Hydroxylamin bildet sich Hydroxamsäure nach:

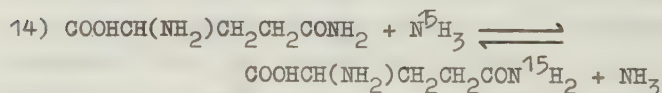


Die Hydroxamsäure wird nach L i p m a n n und T u t t l e durch Reaktion mit $FeCl_3$ (41) bestimmt. Dadurch kann man den quantitativen Ablauf der Glutaminbildung colorimetrisch verfolgen.

Von H. W a e l s c h et al. (43) und bald danach von K. S t u m p f (44) wurde ein Enzym nachgewiesen, das den Austausch der Amidgruppe des Glutamins mit Hydroxylamin katalysiert:



oder die NH_2 -Gruppe des Säureamids mit Ammoniak austauscht (45):



Diese Glutamotransferase ist in Mikroorganismen, Pflanzensamen und tierischen Organen gefunden worden (46) und benötigt Mn^{++} zur Reaktion. Die Glutaminsynthetase konnte von H. E l l i o t t 2200 fach

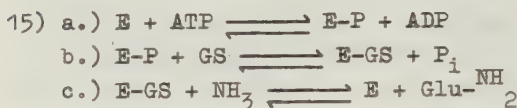
gereinigt werden und es zeigte sich, daß dabei gleichzeitig die Aktivität der Glutamotransferase anstieg (40). Bei der Transferase-Reaktion werden nur katalytische Mengen von ATP (oder ADP) gebraucht und es kann keine ATP-Spaltung nachgewiesen werden, während bei der Synthetase-Reaktion ATP stöchiometrisch mit der Synthese gespalten wird. Die Glutamotransferase kann demnach die Energie der Amidbindung ausnutzen (47). L. L e v i n t o w und A. M e i s t e r (48) fanden bei Ultrazentrifugenversuchen beide Enzymaktivitäten in derselben monodispersen Komponente, was auf die Gleichartigkeit beider Enzyme schließen läßt.

Wie aus Gl. 11 hervorgeht, katalysiert die Glutaminsynthetase eine stöchiometrische Reaktion zwischen ATP, Glutaminsäure und Ammoniak in Gegenwart von Mg^{++} , wobei Glutamin, ADP und anorganisches Phosphat gebildet wird (38). W.H. E l l i o t t (40) versuchte bereits, den Mechanismus dieser Reaktion zu klären. Er vermutete zwei Reaktionsschritte, die durch dasselbe Enzym katalysiert werden:

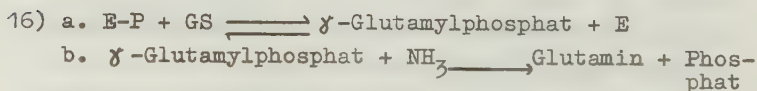
- a.) die Aktivierung einer der Komponenten (Glutaminsäure oder Ammoniak) durch Reaktion mit ATP und
- b.) die Bildung von Glutamin aus dem Zwischenprodukt und der zweiten Komponente.

Um das aktivierte Zwischenprodukt zu finden, inkubierte er Enzym und ATP entweder mit Glutaminsäure oder mit Ammoniak. Anorganisches Phosphat, das bei der Gesamtreaktion stöchiometrisch frei wird, wurde beim Fehlen einer der Glutaminkomponenten kaum gebildet. Es konnte demnach keine Reaktion zwischen ATP und Glutamat oder Ammoniak im Experiment nachgewiesen werden. Daraus schloß H. Elliott, daß das Zwischenprodukt fest an die Enzymoberfläche gebunden sein muß und daher nicht nachweisbar ist. F. S p e c k (38) gelang es ebenfalls nicht, ein Glutamylphosphat nachzuweisen.

Nachdem es nicht möglich war, das Zwischenprodukt zu isolieren, versuchte man durch Isotopenaustausch einen Einblick in den Mechanismus zu erhalten. C. Webster und E. Varner (49) inkubierten die Komponenten der Glutaminsynthese mit radioaktivem anorganischen Phosphat und konnten auf Grund des Einbaus von ^{32}P in ATP folgende Reaktionsgleichungen vorschlagen:



Der Austausch des ^{32}P mit dem endständigen Phosphat des ATP stieg in Gegenwart von Glutamat stark an, mit Enzym und ATP allein fand ein geringer Einbau statt, was auf ATPase-Wirkung zurückgeführt wurde. Mit Enzym, ATP, Glutamat und Ammoniak war kein nennenswert größerer Einbau mehr zu verzeichnen. Bereits im nächsten Jahr korrigierten jedoch die Verfasser ihren Vorschlag (50), da es sich zeigte, daß Ammoniak für den Phosphataustausch notwendig ist. Es genügen bereits geringe Mengen, die im obigen Inkubationsansatz immer mit vorhanden waren. Erst bei der Glutaminbildung wird anorganisches Phosphat frei. Es bildet sich zunächst aus Enzymphosphat und Glutaminsäure ein γ -Glutamylphosphat und Enzym. Dieses Zwischenprodukt soll weiter mit Ammoniak unter Bildung von Glutamin und Phosphat reagieren:



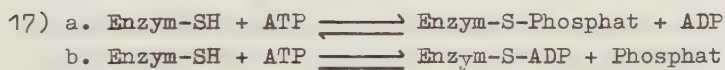
Nach Meister (51) soll Reaktion 16)b. umkehrbar sein.

Aber auch jetzt konnte das aktivierte Zwischenprodukt, das γ -Glutamylphosphat, nicht isoliert werden.

Mit synthetisiertem γ -L-Glutamylphosphat konnte in Gegenwart von Glutaminsynthetase aus Erbsen und Ammoniak keine Glutaminbildung nachgewiesen werden (52). Alle Ergebnisse deuten darauf hin, daß freies γ -Glutamylphosphat an der enzymatischen Synthese von Glutamin nicht beteiligt ist, während ein enzymgebundenes Anhydrid zwischen Glutaminsäure und Phosphat durchaus das Zwischenprodukt darstellen kann.

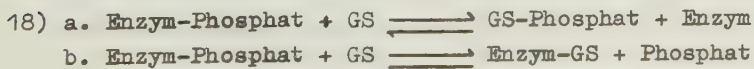
Nach anderen Befunden geht der Reaktion mit Glutaminsäure wahrscheinlich eine Phosphorylierung des Enzyms durch ATP unter ADP-Abspaltung voraus. Da sich die Glutaminsynthese durch SH-Reagenzien (40, 53) hemmen läßt, kann man auf eine Beteiligung von SH-Gruppen schließen. M. Stachelin et al. (54) konnten nachweisen, daß die SH-Gruppen direkt mit dem ATP reagieren.

Für die Phosphorylierung des Enzyms mit dem ATP liegen zwei Möglichkeiten vor:



Die zweite Möglichkeit kommt jedoch nicht in Betracht, da radioaktives Phosphat nur sehr gering ohne Substrat in ATP eingebaut wird (49), während mit ADP^{32} ein Einbau in inaktives ATP zu verzeichnen ist, wenn auch nur unter experimentellen Schwierigkeiten, da sich hier Myokinase als Begleitenzym der Glutaminsynthetase störend bemerkbar macht.

Für die Reaktion des Enzymphosphats werden wiederum zwei Möglichkeiten diskutiert. Es kann, wie aus den Gleichungen 15) und 16) hervorgeht, unter Bildung von γ -L-Glutamylphosphat und Enzym (Gl.18)a.) oder Glutamyl-Enzym und Phosphat (Gl.18)b.) weiterreagieren:



Versuche mit Glutaminsäure, die in der γ -Carboxylgruppe mit ^{18}O markiert war, konnten keine restlose Klärung bringen (24). Man fand den markierten Sauerstoff im anorganischen Phosphat und schloß auf Glutamylphosphat als Zwischenprodukt. Das gebildete ADP blieb inaktiv (56, 57).

P. D. B o y e r brachte einen neuen Vorschlag zur Diskussion. Danach soll das Enzym zuerst Glutamat und Ammoniak binden und dann findet Glutaminbildung durch ATP in noch unbekannter Weise statt (58). In einer späteren Arbeit schlägt er ein Schema für diese Reaktionsfolge vor (59):

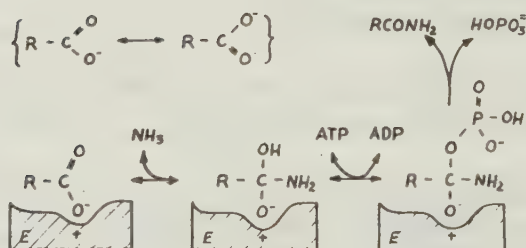


Abb. 2

Ein positives Zentrum des Enzyms lagert sich an den negativ geladenen Carboxylsauerstoff des Glutamats. Nach anschließender Ammoniakanlage besteht die Rolle des ATP in der Phosphorylierung der Additionsverbindung, um "den unerwünschten Sauerstoff zu entfernen". Die dazu durchgeführten Ver-

suche konnten jedoch noch keine Lösung des Problems bringen.

Da nach L. Levintov u.a. (48) und J.E. Varner u.a. (50) ohne Ammoniak kein Phosphataustausch möglich ist, hält es Buchanan (60) für wahrscheinlich, daß die Reaktion mit Ammoniak, d.h. die Bildung der Amidbindung, und die ATP-Spaltung gleichzeitig vor sich gehen, nachdem Glutaminsäure, ATP und Ammoniak auf dem Enzym spezifisch fixiert worden sind. Buchanan schlägt den Namen 'Kinosynthase' für eine Reihe von Enzymen vor, die ATP (oder ein anderes Nucleosidtriphosphat) für die Synthesen, die sie katalysieren, benötigen (61).

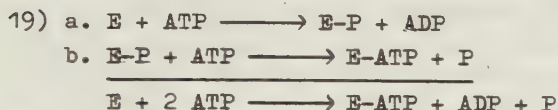
Ein wesentlicher Hinweis auf ein aktiviertes Glutamatzwischenprodukt ist die Bildung von Pyrrolidoncarboxylat. Nach H. Meisler (62) wird hoch gereinigte Schafhirn-glutaminsynthetase durch ATP und Mg^{++} vor Hitzedenaturierung geschützt, was auf eine spezifische Verbindung zwischen Enzym und ATP schließen läßt. Aus einer Mischung von ammoniakfreien Enzym, ATP, Mg^{++} und Glutamat, die über bestimmte Zeit auf 100° erhitzt wird, bildet sich Pyrrolidoncarboxylat (PC) in einer dem Enzymprotein entsprechenden Menge. Nun ist bekannt, daß γ -Glutamyl-derivate beim Erhitzen schneller cyclisieren als Glutamat. Es müßte, wenn ein enzymgebundenes, γ -aktiviertes Glutamat entsteht, Cyclisierung schneller eintreten als bei den Kontrollen. Dies konnte bestätigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Bindung des Glutamats an das Enzym ATP und Mg^{++} braucht. Die Bindung ist verbunden mit der Spaltung des ATP und der Bildung von γ -carboxyl-aktiviertem Glutamat. Das geschieht in Abwesenheit von Ammoniak und ohne Bildung von Glutamin. Gibt man Ammoniak dazu, bildet sich weniger PC, aber Glutamin (63).

Th. Wieland, G. Pfeiderer und B. Sandmann (66) haben für die enzymatische Bildung von Glutamin einen Mechanismus vorgeschlagen, nach welchem der "aktiven" Glutaminsäure die Struktur eines γ -Glutamylphosphats zukommt, das über seinen Phosphatrest in covalenter Bindung an die Wirkstelle des Enzyms gebunden ist. Aus Hochspannungselektrophorese-Versuchen mit Glutaminsynthetase und in γ -Stellung ^{32}P -haltigem ATP ging außerdem hervor, daß ATP vom Enzym in einer festen Bindung fixiert wird, sodaß das in Gl. 17 vorgeschlagene Enzymphosphat nicht vorliegen kann. Bei hydrolytischer Zerlegung findet man ATP und Enzym unverändert wieder. Bei Inkubation von Enzym, ^{32}ATP und L-Glutamat tritt nach Elektrophorese wieder Radioaktivität an das Enzymprotein gebunden auf. Nach Elution und anschließender hydrolytischer Spaltung entfallen jetzt davon 85 % auf Monophosphat, sodaß das andere Bruchstück des ATP als ADP freigesetzt worden sein muß.

In analogen Versuchen mit Enzym, das durch Dowex 50-Behandlung und Dialyse möglichst ammoniakfrei vorliegen sollte, nicht radioaktivem ATP und ^{14}C -Glutamat findet man nach der Elektrophorese die radioaktive Bande des Glutamats und außerdem Radioaktivität an das Protein gebunden. Nach Elution der Enzymzone und Hinzufügen von NH_4Cl -Lösung wurden Glutamin und Glutaminsäure in einem Verhältnis von 4:4 gefunden, während ohne Hinzugabe von NH_4Cl das Verhältnis von 1:5 vorlag. Letztere Bildung von Glutamin ist auf Spuren von Ammoniumionen zurückzuführen, denn es ist außerordentlich schwer, die Versuchsansätze vollkommen ammoniakfrei zu erhalten.

Da der Enzym-ATP-Komplex sehr beständig ist, scheint eine echte chemische Bindung wahrscheinlicher zu sein als eine gewöhnliche salzartige Bindung des ATP an das Enzym. Dafür muß aber die Spaltung einer zweiten energiereichen Bindung gefordert werden. Es könnte

zur Bindung eines Moleküls ATP an das Enzym die freie Energie einer zweiten ATP-Molekel verwendet werden, die dabei in ADP und Monophosphat zerfällt. Th. W i e l a n d et al. schlagen daher folgenden Mechanismus für die ATP-Bindung an das Enzym vor:



Mit L-Glutamat wird aus dieser Enzym-ATP-Verbindung ADP abgespalten:



Diese "aktivierte Glutaminsäure" reagiert mit Ammoniak zu Glutamin:

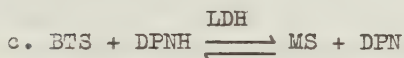
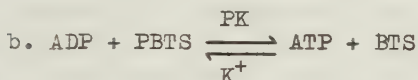
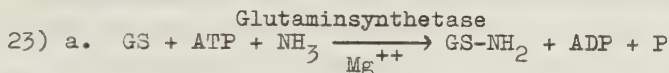


Da sich die Glutaminsynthetase durch SH-Reagenzien hemmen läßt, (40, 53, 54), wurde für die bereits oben erwähnten Wirkstelle des Enzyms eine SH-Gruppe postuliert und die energiereiche S-Phosphatbindung (67, 68) in den folgenden Vorschlag zur enzymatischen Glutaminbildung mit einbezogen:

das Enzym bei späteren Versuchen zum Wirkungsmechanismus innerhalb weniger Minuten bestimmt werden konnte.

Der Reinheitsgrad eines Enzyms wird durch seine "spezifische Aktivität" ausgedrückt. Sie ist das Verhältnis aus der Anzahl der Enzymeinheiten (EE) zu dem Proteingehalt (mg) des betreffenden Präparats. Der Proteingehalt wird nach der Biuretmethode ermittelt (70).

Die Enzymeinheiten werden spektrophotometrisch durch folgenden gekoppelten Enzymtest bestimmt (66):



Dieser optische Test beruht darauf, daß die glutaminbildende Reaktion mit einer DPNH-abhängigen Enzymreaktion gekoppelt wird. Die Geschwindigkeit der DPNH-Abnahme ist, wenn Substrate und Hilfsenzyme im Überschuß vorhanden sind, der im ersten Reaktionsschritt gebildeten ADP-Menge (Gl. 23) a.) proportional. Das ADP wird durch Phosphoenolbrenztraubensäure (PBTS) wieder zu ATP phosphoryliert, wobei Brenztraubensäure (BTS) gebildet wird (Gl. 23) b.), die in Gegenwart von Milchsäuredehydrogenase (LDH) mit hydriertem Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) zu Milchsäure (MS) hydriert wird (Gl. 23) c.). Die Geschwindigkeit der DPNH-Dehydrierung ist außerdem der zugegebenen Enzymkonzentration proportional und somit ein direktes Maß für die Enzymaktivität. Im Eppendorf-

Photometer kann optisch bei $366\text{ m}\mu$ die Abnahme der DPNH-Konzentration leicht verfolgt werden. Dabei wird die Zeit gemessen, in der die Extinktion um 0,1 abnimmt. Diese Zeit t ist der Enzymkonzentration umgekehrt proportional. Die Zahl der EE einer Enzymlösung errechnet sich sodann nach Bücher et al. (69):

24) Enzymeinheiten/Enzymlösung =

$$\frac{100 \cdot \text{Testvolumen (ml)} \cdot \text{Volumen der Enzymlösung(ml)}}{t \text{ (sec)} \cdot \text{pipettierte Enzymmenge (ml)}}$$

Im Testansatz können noch andere Faktoren DPNH-Verbrauch bewirken, z.B. ATPase als Verunreinigung der Glutaminsynthetase oder ADP im ATP. Beide bewirken nach Gl. 23 bereits eine Abnahme der DPNH-Konzentration. Enthält das Enzym Myokinase als Verunreinigung, so bildet sich aus ATP und AMP, das ebenfalls in der ATP-Lösung oder im zugesetzten DPNH enthalten sein kann, ADP, das wiederum DPNH umsetzt. Es wird daher die Synthetasereaktion erst durch Hinzufügen von Glutaminsäure ausgelöst und die Differenz der Reaktionsgeschwindigkeiten vor ($v_0 = \frac{100 \cdot k_0}{t_0}$) und nach ($v_1 = \frac{100 \cdot k_1}{t_1}$) Glutaminsäurezugabe bei der Berechnung der Synthetaseaktivität beachtet. Der Blindwert t_0 ist gleichzeitig ein Maß für die Reinheit des Enzyms. Bei hochgereinigten Enzymlösungen betrug er z.B. 30 Min., im Gegensatz zu $t_1 = 8 \text{ sec.}$ mit Glutaminsäure.

b. Isolierung der Glutaminsynthetase.

Das verwendete Enzym wurde aus den Samen von *Pisum sativum* nach H. Elliott (40) aufgearbeitet. Die beiden letzten Reinigungsschritte der Vorschrift - Dialyse und 2. Nukleinsäurefällung - wurden nicht durchgeführt, da bei der Dialyse von Glutaminsynthetase stets ein wesentlicher Aktivitätsverlust ein-

tritt (71). Diese Enzymaufarbeitung führt nach B. Sandmann (71) bis zu einer spezifischen Aktivität von 34 (ca. 60 fache Reinigung). Achtet man jedoch bei der Nukleinsäure - und II. Ammonsulfatfällung auf eine gute Trennung von Enzym- und inaktivem Protein, so kann man bis zu einer spezifischen Aktivität von 65 (ca. 112 fache Reinigung) gelangen.

Einige Aufarbeitungen zeichneten sich von vornherein durch einen wesentlich höheren Synthetasegehalt aus, sodaß mit denselben Reinigungsschritten eine spezifische Aktivität von 103 (ca. 180 fache Reinigung) erreicht wurde. Eine jahreszeitliche Schwankung im Enzymgehalt der Samen konnte aber nicht beobachtet werden.

Um den Aktivitätsverlust während des vorletzten Reinigungsschrittes (Dialyse) aus der Vorschrift von H. Elliott (40) zu vermeiden, wurde die Synthetase mit anderen Methoden weiter gereinigt.

a) Fraktionierte Ammonsulfatfällung.

Durch Aussalzen mit steigenden Mengen Ammonsulfat können Proteine verschiedener Löslichkeit getrennt und somit gereinigt werden.

Zu nach H. E l l i o t t hergestellter Enzymlösung der Ammonsulfatmolarität 0,44 wird bis zur ersten Trübung bei einer Temperatur von 0 - 3°C gesättigte Ammonsulfatlösung zugegeben. Der Niederschlag wird durch hochtouriges Zentrifugieren von der restlichen Lösung getrennt und in $\frac{m}{10}$ Phosphatpuffer p_H 7,2 aufgenommen. Nach Aktivitätsmessungen und Proteinbestimmungen im Überstand und im aufgenommenen Niederschlag zeigte es sich, daß bereits die Hälfte des eingesetzten Proteins und nur 1/6 der Enzymaktivität nach der ersten Ammonsulfatzugabe ausgefallen waren. Die Ammonsulfatmolarität im Überstand betrug jetzt 1,04.

Die Fällungen werden so oft wiederholt, bis keine Enzymaktivität mehr im Überstand zu messen ist. Zwischen der Ammonsulfatmolarität 1,47 und 1,85 fällt die Hauptmenge des Enzyms aus. Man erhält eine Enzymfraktion mit einer spezifischen Aktivität von 113.

β) Adsorption an Calciumphosphatgel.

Die Brauchbarkeit von Calciumphosphatgel als Adsorbens wurde 1956 von Tiselius gefunden. Irreversible Adsorption von Proteinen durch Denaturierung an der Oberfläche bei der Adsorptionschromatographie z.B. konnten nunmehr ausgeschlossen werden.

Proteine werden aus verdünnten, neutralen Puffern ~~an~~ an das Gel adsorbiert und können mit ansteigenden Pufferkonzentrationen stufenweise eluiert werden. Mit steigendem p_H fällt die Adsorptionsfähigkeit des Gels ebenfalls. Mit dem möglichen Mechanismus der Calciumphosphatgeladsorption befaßt sich eine neuere Arbeit von B o S ö r b o (72), wonach Proteine unterschiedlicher Basizität verschiedenes Verhalten zeigen.

Frisch bereitetes Calciumphosphatgel nach D. K e i l l i n und E. F. H a r t r e e (73) wird in steigenden Mengen an die zu reinigende Enzymlösung gegeben. Das Enzym wird vorher zur Salz Entfernung mehrere Stunden gegen Aqua bidest. bei $0^{\circ}C$ dialysiert und in verdünntem Puffer aufgenommen. Bei jeder Gelzugabe werden nach dem Abzentrifugieren im Überstand Aktivitäts- und Proteinbestimmungen durchgeführt. Man gibt solange Gel zu, bis entweder nennenswerte Mengen des inaktiven Proteins vom Gel adsorbiert worden sind und das Enzymprotein somit stark gereinigt im Überstand bleibt, oder bis das gesamte Enzym adsorbiert worden ist. Für die Glu-

taminsynthetase ergab sich dabei folgendes Bild:

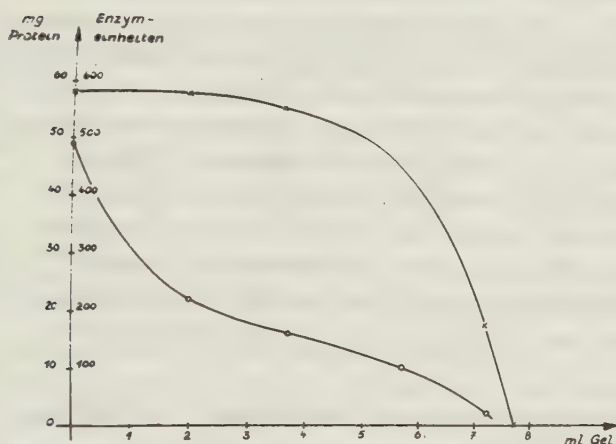


Abb. 3 Abnahme der Enzymeinheiten (x-x-x) und des Proteins (---) im Überstand bei steigender Gelzugabe.

Man sieht deutlich, daß zunächst Fremdprotein vom Gel schneller adsorbiert wird, als das enzymeigene Protein. Bei weiterer, relativ geringer Gelzugabe wird das gesamte Enzym adsorbiert.

Aus der folgenden Tabelle ist die Zunahme der spezifischen Aktivität der Enzymlösung im Überstand während der Geladsorption gut zu erkennen:

Tab. 1

Frakt.	ml Gel	Einh./ml	Gesamt-einh.	Prot./ml (mg)	Gesamt-prot. (mg)	Spez. Akt.
-	0	29	580	2,46	49,2	11,6
1	2	29	580	1,1	22	26
2	3,7	28	560	0,8	16	35
3	5,7	24	480	0,5	10	48
4	7,2	9	180	0,1	2	90
5	7,7	0	0	-	-	-

Nachdem keine Aktivität mehr im Überstand zu messen war, wurden die letzten 2 Gelfractionen vereinigt und mit steigend konzentriertem Phosphatpuffer pH 7,2 gewaschen. Aus Vorversuchen hatte sich ergeben, daß sowohl Synthetase als auch anderes Protein von Pufferlösungen, die stärker als $m/30$ verdünnt waren, nur in geringem Maße eluiert werden. Es wurden daher nur noch $m/10$ und $m/2$ Phosphatpuffer angewendet. Mit $m/10$ Phosphatpuffer werden 66 % des am Gel befindlichen Proteins und nur 24 % Glutaminsynthetase eluiert, sodaß man danach mit $m/2$ Phosphatpuffer eine gut gereinigte Enzymfraktion erhielt. Ihre spezifische Aktivität betrug 183. Das entspricht einer durch den Gelschritt erzielten 16fachen Reinigung.

Abb. 4 zeigt die graphische Darstellung der Elution:

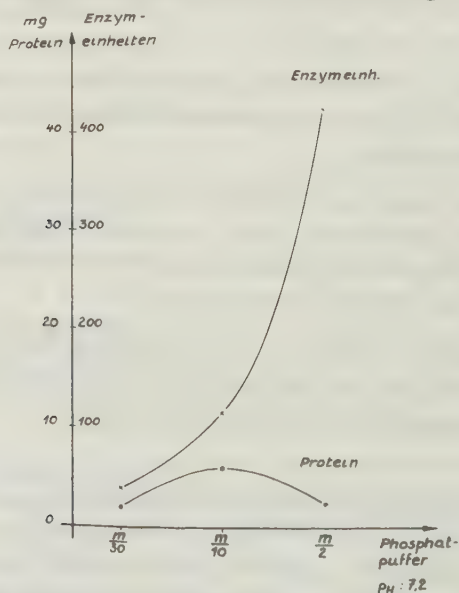


Abb. 4 Elution der an Calciumphosphatgel adsorbier-
ten Glutaminsynthetase mit Phosphatpuffer
 pH 7,2 verschiedener Molarität.
(Enzym: x - x - x; Protein: o - o - o)

Die folgende Tabelle zeigt den Aktivitäts- und Proteingehalt der einzelnen Eluate:

Tab. 2

Phosphat- puffer P _H 7,2	Einh./ml	Gesamt- einheiten	Prot./ml (mg)	Gesamt- protein (mg)	Spez. Akt.
m/30	0 - 3	0 - 42	0,11	1,5	-
m/10	8,2	115	0,44	6,1	19
m/2	30	420	0,17	2,3	183
Gel nach Elution	-	-	-	0,6	-

Die Gelreinigung wurde mehrmals wiederholt. Es ergab sich stets das nahezu gleiche Bild, nur waren die benötigten Gelmengen für gleiche Volumina Enzymlösung unterschiedlich, da diese vom Alter des Gels abhängig sind.

Das durch Gel gereinigte Enzym enthielt oft sehr geringe Mengen Protein/ml (z.B. 0,17 mg/ml), sodaß die zur Proteinbestimmung übliche Biuretmethode nicht mehr exakt anwendbar war, es sei denn, wir hätten einen großen Teil der soeben erhaltenen hochgereinigten Enzymlösung lediglich zur Proteinbestimmung verwendet. Die Ausarbeitung einer Mikroproteinbestimmungsmethode wurde somit erforderlich. Es sollen aber zunächst alle erprobten Reinigungsarten der Glutaminsynthetase aufgeführt werden, Die Mikrobestimmungsmethode für Proteine wird im Anschluß daran Erwähnung finden.

γ) Säulenchromatographie mit Carboxymethyl (CM)-cellulose.

Zur Trennung von verschiedenen Proteinen durch chromatographische Methoden wird seit Jahren chemisch veränderte Cellulose als Adsorbens häufig verwendet.

Mit künstlich in die Cellulose eingeführten basischen oder sauren Gruppen können Kationen- oder Anionenaustauscher hergestellt werden.

Es sollte versucht werden, ob die CM-Cellulose die Glutaminsynthetase als Kation zu binden vermag. Der isoelektrische Punkt der Glutaminsynthetase ist noch nicht bekannt, da aber das Enzym bei der Aufarbeitung beim p_H 6,5 gefällt wird, nahmen wir an, daß es beim p_H 6,0 bereits als Kation vorliegt.

Nach E. P e t e r s o n u.a. (74, 75) werden für 64 mg Protein 2 g Austauscher benötigt. Nachdem mit 2 g Austauscher eine Säule hergestellt worden war, wurde die zu reinigende Glutaminsynthetase gegen denselben Puffer dialysiert, mit dem die Säule equilibriert worden war (0,005 m Phosphatpuffer p_H 6,0). Nach 15 stündiger Dialyse waren noch 2/3 der ursprünglichen Enzymaktivität vorhanden. 1/3 des Proteins denaturierte ebenfalls in dieser Zeit.

Nachdem das Enzym auf die Säule gegeben worden war, wurde mit 100 ml 0,005 m Phosphatpuffer p_H 6,0 nachgewaschen und die Eluate in 10 - ml-Fraktionen bei einer Tropfgeschwindigkeit von 0,4 ml/Min. aufgefangen. Mit 0,05 m Phosphatpuffer p_H 7,0 sollte das Enzym eluiert werden, das gesamte Protein war jedoch bereits in den ersten beiden Fraktionen des 0,005 m Phosphatpuffers nachweisbar. Glutaminsynthetase wird demnach von CM-Cellulose bei p_H 6,0 nicht gebunden. Bei niedrigeren p_H -Werten konnten die Ionenaustauschversuche nicht durchgeführt werden, da das Enzym, sobald es längere Zeit im Sauren gehalten wird, denaturiert.

Eine weitere Reinigung der Glutaminsynthetase durch Hitzeschritt oder Acetonfällung ließ sich nicht erreichen, da hierbei die Enzymaktivität verloren ging.

Tab. 3

Reinigung der Glutaminsynthetase aus *Pisum sativum*.

	Enzymeinheiten/ml	Protein/ml (mg)	Gesamteinheiten	Spez. Akt.
1. Extraktion	-	8,48	-	-
2. I. Ammonsulfatfällung	39	28,9	52 260	1,4
3. Protaminsulfatfällung	30	14,6	51 000	2,06
4. I. Nucleinsäurefällung	311	15,8	27 990	19,7
5. II. Ammonsulfatfällung	1225	18,7	22 050	65,5
6. fraktionierte Ammonsulfatfällung	2480	22	14080	113
7. Calciumphosphatgelbehandlung ¹⁾	-	-	-	183

1) Hierfür erhaltene Werte (s. Text) stammen aus anderen Enzymaufarbeitungen und sind daher in bezug auf die Veränderung der Gesamtenzymeinheiten bei den einzelnen Reinigungsschritten nicht mit obiger Tabelle zu vergleichen.

B. I. 2. Zwei neue Mikrobestimmungsmethoden.

a.) Mikromethode zur Bestimmung von Proteinen.

Zum quantitativen Nachweis von Proteinen unter 1 mg modifizierten wir eine von H. Nielsen (85) und H. Mattenheimer (86) beschriebene Methode.

Nachdem wir festgestellt hatten, daß bei der Herstellung der Eichkurve große Schwankungen in Abhängigkeit von der Größe der zugegebenen Diäthylthiocarbamat (DDTC)-Kristalle zum vorher gebildeten Kupferproteincomplex auftraten, die sich auch mit einer Standardlösung von DDTC nicht ausgleichen ließen, verzichteten wir auf die kolorimetrische Bestimmung der durch DDTC sich bildenden gelben Farbe. Statt dessen ließ sich das in Na_3PO_4 suspendierte, vorher durch TCE gefällte Protein durch Zugabe von Kupfersulfatlösung kolorimetrisch bei 546 $\text{m}\mu$ sehr gut messen. Nach 30 Minuten bleibt der Farbwert konstant. In dieser Zeit müssen die Proben gerührt werden. Dazu schichteten wir die Gläser übereinander in eine schräg gehaltene Glassäule, die ans Rührwerk angeschlossen wurde. Es muß soviel Kupfersulfat zugegeben werden, daß nach 30 Minuten noch ein Bodensatz bleibt.

Tab. 4: Eichwerte

Protein[γ]	50	100	200	300	500	700
Mittelwert (E 546 $\text{m}\mu$)	0,006	0,009	0,0205	0,031	0,053	0,075
Schwankung	0,005 -0,008	0,08- 0,015	0,019- 0,0253	0,029- 0,038	0,05- 0,061	0,073- 0,079

Eichsubstanz: Rinderserumalbumin.

Der Mittelwert wurde aus jeweils 5 Messungen errechnet. Die bereits abgezogenen Blindwerte schwanken zwischen 0,050 und 0,058. Ihr Mittelwert beträgt 0,054. (S. auch prakt. Teil).

Es wurde schon mehrfach darauf hingewiesen, daß sich bei Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Glutaminsynthetase, bei denen man Zwischenprodukte zu erhalten hoffte, die Anwesenheit von Ammoniumionen störend bemerkbar macht, da mit ihnen die "aktivierte Glutaminsäure" sofort zu Glutamin weiterreagiert. Um dieses Zwischenprodukt nachweisen zu können, waren entweder andere Methoden erforderlich, oder zumindest die quantitative Entfernung von Ammoniumionen. Dazu mußte zunächst nach einer empfindlichen Mikrobestimmungsmethode für Ammoniak gesucht werden.

b.) Mikrobestimmungsmethode für NH_3 .

J.A. R u s s e l l beschrieb 1944 eine kolorimetrische Bestimmung von Ammoniak (76). $0,1\gamma$ /ml kann gut bestimmt werden, aber die Methode ist nur bis $0,5\gamma$ anwendbar.

In einer von W. T h o r n und T. H e i m a n n 1956 veröffentlichten NH_3 - Mikrobestimmungsmethode (77) wird ein von Conway 1936 angegebenes System modifiziert. Der in Gewebsextrakt enthaltene freie Ammoniak wird durch gesättigte Kaliumbicarbonatlösung ausgetrieben und diffundiert in einem geschlossenen System in Nessler's Reagenz, dessen Extinktionszunahme photometrisch bestimmt wird. Größere Extraktvolumina als $0,5$ ml sollen wegen einer Behinderung der Diffusion nicht verwendet werden. $0,5 - 3\gamma$ Ammoniak-N können bestimmt werden.

Um vor kinetischen Messungen den gesamten Versuchsansatz (ca $3,5$ ml) auf Ammoniakfreiheit prüfen zu können, mußten wir eine Methode finden, mit der noch größere Volumina auf ihren Ammoniakgehalt untersucht werden konnten. Da diese Versuchsansätze und auch unsere hochgereinigten, ammoniakfreien

Enzymlösungen farblos waren, konnten sie direkt in Nessler's Reagenz einpipettiert werden. Nessler's Reagenz I und II (Merck) wurden 1:1 gemischt und 1:50 verdünnt. In größeren Verdünnungen ist keine genaue Messung mehr möglich, während konzentriertere Ansätze einen zu hohen Blindwert ergeben, sodaß geringe Extinktionsänderungen, wie sie von $1/2 - 5\gamma$ Ammoniak-Stickstoff bewirkt werden, nicht zu erfassen wären.

Es wurde nur durch Kationen- und Anionenaustauscher gereinigtes Wasser verwendet. Mit bidestilliertem Wasser liegt der Blindwert bereits zu hoch.

Tab. 5: Eichwerte

γ Ammoniak-Stickstoff	0,5	1	2	3	4	5
Mittelwert (E 546 m μ)	0,025	0,049	0,097	0,147	0,187	0,245
Schwankung	0,014- 0,035	0,041- 0,053	0,088- 0,105	0,138- 0,153	0,181- 0,194	0,237- 0,254

Eichsubstanz: getrocknetes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Der Mittelwert wurde aus jeweils 8 - 12 Messungen errechnet. Die Blindwerte schwanken zwischen 0,065 - 0,087. Mittelwert = 0,07.

Die Eichung wurde bis zu 5γ Ammoniak-N für 4 ml Nessler's Reagenz 1:50 verdünnt in einem Endvolumen von 5 mg durchgeführt. Die Extinktionszunahme verläuft linear.

B. I. 3. Quantitative Entfernung von Ammoniumionen.

a. aus Glutaminsynthetase.

Gut bewährte sich der mit Na^+ beladene Kationenaustauscher Amberlit IRC 50. Das Enzym verlor durch diese Behandlung 35 % seiner Anfangsaktivität und lag nach Säulendurchlauf (Säule: 10 x 100 mm) in einer Verdünnung von 1:4 vor. Der Ammoniakgehalt war von 6 mg/ml Enzymlösung auf 3,8 /ml gesunken. Durch anschließende kurze Dialyse gegen bidestilliertes, NH_3 -freies Wasser wurden die restlichen Ammoniumionen entfernt.

Um das Enzym nach Abtrennung der Ammoniumionen in konzentrierterer Form zurück zu erhalten, wurde die Dialyse durch Ultrafiltration ersetzt. Mit einem Druck von 10 kg/cm² werden mit Stickstoff aus der verdünnten Enzymlösung Wasser und Salze durch eine semipermeable Membran gepreßt, sodaß nur das Protein zurückbleibt. Durch aqua bidest. kann der Überstand nachgewaschen werden. Leider zeigte sich, daß während der Ultrafiltration 99 % des eingesetzten Enzyms danaturierten.

Eine Abtrennung der Ammoniumionen vom Enzym durch Elektrodialyse zeigte ebenfalls 50 - 60 % Aktivitätsverlust. Es wurde auf der Hochspannungselektrophorese aus einer Stärkeplatte ein Graben ausgehoben, in den in eine Folie mit Enzym angeteigtes Glaspulver gefüllt wurde (89, 90). Bei 25 V/cm, pH 8,6 mit m/20 Tris-Citratpuffer müßte sich Ammoniak schnell vom Enzymprotein, das bei diesem pH nicht wandert, trennen. Tatsächlich war der Folieninhalt aber erst nach mehreren Stunden ammoniakfrei, was bereits zu starkem Aktivitätsverlust geführt hatte.

Das seit 1959 bekannte Sephadex, das zur Trennung von Substanzen unterschiedlicher Molekülgröße entwickelt worden ist, (J. P o r a t h u.a. 79, 80) wendeten wir mit sehr gutem Erfolg zur Trennung von

Protein und Ammoniumsulfat an. Wir beschickten eine kleine Säule von Sephadex G 25 mit 2 ml Enzymlösung, die je 6 mg Ammoniumsulfat enthielten. Nach dem Durchlaufen der Säule waren die, die Enzymaktivität enthaltenden Fraktionen völlig frei von Ammoniumionen (s. Abb. 5).

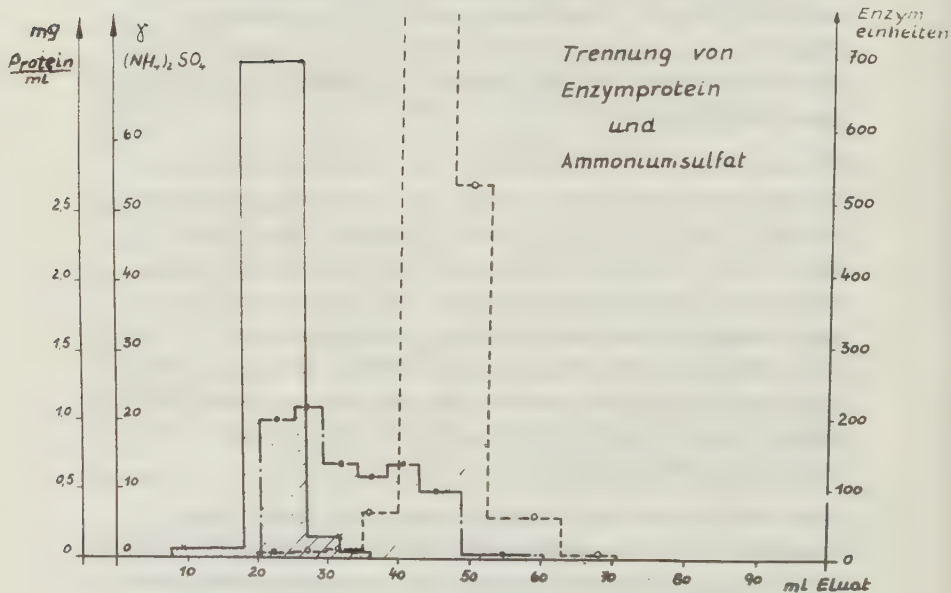


Abb. 5 Trennung von Protein und Ammoniumsulfat durch Sephadex G 25. (--- Protein; o-o-o (NH₄)SO₄; x-x-x Enzymeinheiten).

Die Abbildung zeigt deutlich die gute Trennung der Glutaminsynthetase (x-x-x) von Ammoniumsulfat (o-o-o). 96 % der Fermenteinheiten liegen zwischen 18 und 27 ml Eluat. Zwischen 27 und 36 ml steigt der Ammoniak-N-Gehalt bis 6% an und erst nach 36 ml Durchlauf erscheint die Hauptmenge Ammoniumsulfat. Auf-

fallend ist, daß der Proteingehalt in den Eluaten (.-.-.) nicht parallel mit der Glutaminsynthetaseaktivität abnimmt. Durch Sephadex G 25 wird somit gleichzeitig eine Reinigung des Enzyms erreicht. Die verwendete Enzymlösung hatte eine spezifische Aktivität von 103. Sie war nach Filtration durch die Säule bei einem Aktivitätsverlust von 45 % auf 174 gestiegen. Man könnte in den, durch die Biuretreaktion gemessenen Substanzen, die erst nach der Glutaminsynthetase in den Eluaten erscheinen, niedermolekulare Polypeptide erblicken, die, im Gegensatz zum Enzymprotein, bereits in Sephadex G 25 eindringen können. Seine Maschen halten Substanzen bis zu Molekulargewichten von 3500 - 45 00 zurück. Andererseits könnte man daran denken, daß NH_4^+ leichter in die Gelkörner eintreten kann als SO_4^{--} , wodurch eine lokale Übersäuerung auftritt, die ein Denaturieren des Fermentproteins bewirkt, sodaß in den nachfolgenden Eluaten denaturiertes Protein enthalten ist.

b.) Entfernung von Ammoniumionen aus Milchsäuredehydrogenase und Pyruvatkinase.

Da beide Enzyme in 0,5 gesättigter Ammoniumsulfatlösung suspendiert sind, werden sie zunächst zur Entfernung der Hauptmenge des Salzes dialysiert. Am besten bewährte sich für die LDH eine 3stündige Dialyse gegen m/100 Trispuffer pH 7,2. Zur Entfernung der noch verbliebenen Ammoniumionen wurde eine kleine Säule (10x60 mm) IRC 50 verwendet. Die Pyruvatkinase erwies sich auf der Säule als instabil. Durch eine 24 stündige Dialyse gegen 0,5 m Na_2SO_4 -Lösung, die oft gewechselt wurde, konnten ebenfalls die Ammoniumionen entfernt werden.

B. I. 4. Einige Eigenschaften der Glutaminsynthetase.

Auffallend ist der relativ hohe Aktivitätsverlust des Enzyms bei den beschriebenen Versuchen zur Entfernung von Ammoniumionen. Dialysen bei 0°C gegen m/10 K-Phosphatpuffer oder m/10 Trispuffer, beide p_H 7,2 mit und ohne zur Stabilisierung zugesetztem MgSO_4 oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, oder Dialysen gegen m/15 Na_2SO_4 brachten Aktivitätsverluste um 50 %. Läßt man dagegen das Enzym 12 Stunden bei 0°C in m/10 Trispuffer p_H 7,2 stehen, tritt keinerlei Aktivitätsverlust auf. Auch gegen mehrstündiges Stehen bei Zimmertemperatur ist das Enzym unempfindlich. Die Aktivitätsabnahmen beim Dialysieren legten die Vermutung nahe, daß dadurch ein Cofaktor der Glutaminsynthetase herausdialysiert. R.L. K i s l i n k (81) verlor durch Dialyse von einem methioninsynthetisierenden Enzym aus *Escherichia coli* 54 % Aktivität, während durch Sephadex G 50 das Coenzym (Folsäure) vollständig abgespalten wird. Die Glutaminsynthetase erfuhr durch Sephadex G 25, wie oben erwähnt, einen Aktivitätsverlust von 45 %, jedoch brachte eine Vereinigung sämtlicher Fraktionen eines Sephadexeluats keine Aktivitätserhöhung. Auch konnte nach Dialyse gegen ein geringes Volumen m/10 Trispuffer, das wieder mit dem Dialysat vereinigt wurde, keine Zunahme der Enzymaktivität beobachtet werden.

Nach F. Speck (38) und W.H. Elliott (39) kann durch einfache Dialyse bei der Glutaminsynthetase kein Coenzym entfernt werden. Durch Hinzufügen von Coenzym-A oder gekochtem Taubenleberextrakt zu inaktivierter Glutaminsäure wurde kein Aktivitätsanstieg beobachtet (W.H. Elliott (40)).

Kaplan und Lipmann (83) fanden ebenfalls kein Co-A in einer Enzymlösung, die 5 Min. gekocht worden war.

Lipmann konnte feststellen, daß Glutaminsynthetase 0,4 % RNS enthält. Wir versuchten, ob die Glutaminsynthetase durch RNase-Verdauung zu inaktivieren ist. Dazu inkubierten wir 20 Stunden bei Zimmertemperatur das Enzym mit RNase und fanden anschließend im optischen Test keinen Aktivitätsverlust. Nachdem wir den Rest des verdauten Enzyms mit Mg^{++} , ATP und Glutaminsäure versetzt hatten, fanden wir nach Hochspannungselektrophorese ebenso neugebildetes Glutamin wie bei den unbehandelten Kontrollen. 20 stündige Dialyse einer zweiten, mit RNase verdauten Enzymprobe, bewirkte eine Aktivitätsabnahme um 50 %, die den unverdauten Kontrollen entsprach. Es wird demnach die Glutaminsynthese durch RNase nicht gehemmt.

Schafhirnsglutaminsynthetase wird nach A. Meisler u.a. (62) bei $+55^{\circ} C$ durch ATP und Mg^{++} vor Hitzedenaturierung geschützt. In analogen Versuchen mit Glutaminsynthetase aus grünen Erbsen finden wir gleiche Ergebnisse bei Erhitzen auf $+40^{\circ} C$. Die mit ATP und Mg^{++} versetzte Probe behält ihre volle enzymatische Aktivität, während das ungeschützte Enzym nach 20 Minuten 62 % seiner Anfangsaktivität verloren hat. Bei $+55^{\circ} C$ denaturieren geschütztes und ungeschütztes Enzym gleichermaßen nach 10 Minuten zu 85 - 90 %.

Glutaminsynthetase kann eingefroren bei $-15^{\circ} C$ mindestens $1\frac{1}{2}$ Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Eine Enzymaufarbeitung, deren Aktivitätsabnahme über 6 Monate beobachtet wurde, zeigte folgende Veränderung der Einheiten/ml:

Tab. 6

Tage	0	7	22	79	146	158	190	206
Enzymeinheiten/ml	1581	1740	1900	2175	696	580	181	161

Auffallend ist die Zunahme der Enzymaktivität während der ersten 2 1/2 Monate. Man könnte das durch den Verlust eines Hemmstoffes in dieser Zeit erklären.

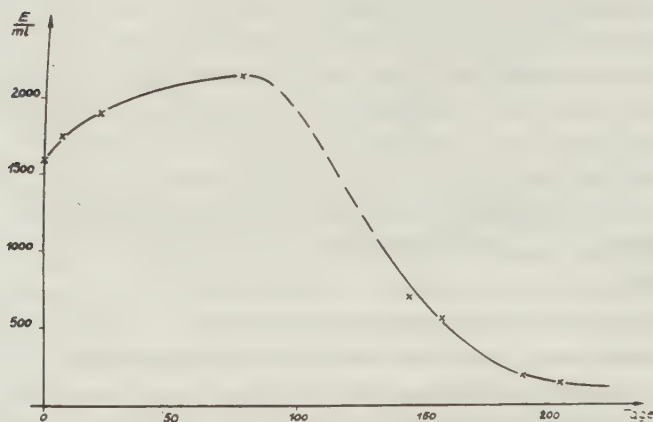


Abb. 6 Stabilität der Glutaminsynthetase bei -15°C .

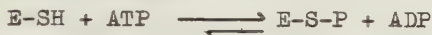
B. II. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Glutaminsynthetase.

1.) Die Zündreaktion.

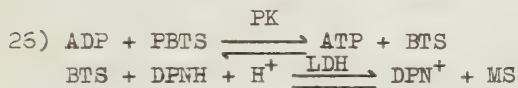
Wie aus den Gleichungen 19a und 22_I hervorgeht, ist der eigentlichen Aktivierungsreaktion eine "Zündreaktion" vorgelagert, bei der eine der Enzymmenge äquivalente ATP-Menge in ADP gespalten und dabei das Enzym phosphoryliert wird. Nach (66) fällt diese Spaltung bilanzmäßig nicht ins Gewicht, denn sie braucht nur einmal vor sich zu gehen,

da das phosphorylierte Enzym bei der Synthese stets zurückgebildet wird (Gl. 21 und 22_{IV}) und den eigentlichen Katalysator der Reaktion darstellt.

25) Zündreaktion:



Wir konnten im optischen Test diese Zündreaktion durch Bestimmung des gebildeten ADP direkt sichtbar machen. Er basiert auf der folgenden gekoppelten Reaktion:



Bei 366 m μ wird im Photometer Eppendorf die Abnahme des DPNH gemessen, die, wie aus Gl. 26 zu ersehen ist, der ADP-Menge proportional ist. Abbildung 7 zeigt die graphische Darstellung eines typischen Versuchs (Vers.I). Es wurden viele gleichlaufende Untersuchungen dazu durchgeführt (s. prakt. Teil).

Es ist deutlich zu erkennen, daß sofort nach Zugabe einer definierten Menge gereinigter Glutaminsynthetase (350 EE) zum Testsystem ATP-Spaltung zu beobachten ist. Zunächst wird mehr, und nach einigen Minuten weniger und konstant ADP gebildet. Dieser konstante "Gang" kann von einer ATPase-Wirkung herrühren. Die zusätzliche ATP-Spaltung ($\Delta E = 0,073$ in Abb. 7) ist, wie aus den zahlreichen durchgeführten Versuchen hervorging, der Enzymmenge direkt proportional (Tab. 7) und von der überschüssigen ATP-Menge unabhängig (Tab. 7 und 8).

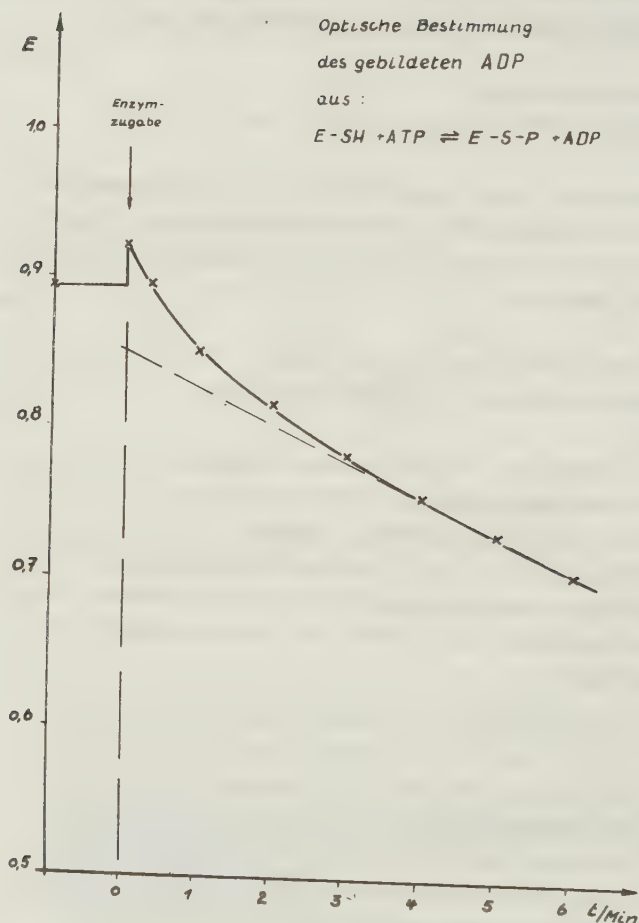


Abb. 7 Optische Bestimmung des während der Zündreaktion gebildeten ADP.

Tab. 7 zeigt die Menge des gebildeten ADP in Abhängigkeit von der zugegebenen Enzymmenge, wie es aus dem optischen Test zu ermitteln war:

Tab. 7

Versuch	Enzym (ml)	ATP (μm)	gebildetes ADP (μm)
1	0,3	1	0,073
2	0,2	1	0,040
3	0,2	3	0,046
4	0,1	3	0,016
5	0,1	10	0,028
6	0,1	10	0,020

Mittelwert: 0,1 ml Enzym $\approx$ 0,022 μm ADP

Die Menge des ADP errechnet sich aus der Extinktionsdifferenz nach folgender Formel:

$$27) \frac{(\Delta E - \text{Gang}) \times \text{Küvettenvolumen}}{3,33 \times 10^6} = M \text{ ADP}$$

wobei ΔE die Extinktionsdifferenz, $3,3 \times 10^6$ den molaren Extinktionskoeffizienten des DFNH bei $366 \text{ m}\mu$ und der "Gang" die konstante ATP-Spaltung durch eine ATPase darstellen.

Das hierfür verwendete Enzympräparat enthielt 1160 Fermenteinheiten/ml. Daraus ergibt sich, daß 53 Fermenteinheiten 0,01 μm ATP bei der "Zündreaktion" spalten.

Da unsere Enzympräparate in Phosphatpuffer aufbewahrt werden, konnte bisher der Einfluß des anorganischen Phosphats auf die Zündreaktion nicht festgestellt werden. Es wurde daher eine zweite Versuchsreihe mit einem Enzympräparat durchgeführt, das in m/10 Trispuffer p_H 7,3 aufgenommen worden

war. Außerdem wurde hierbei die Enzymmenge konstant gehalten, sodaß die ADP-Bildung bei verschiedenen ATP-Mengen gut gemessen werden kann (Tab. 8).

Tab. 8

Nr.	Enzym(ml)	ATP (μm)	gebildetes ADP (μm)	gefundenes ADP: eingesetztem ATP ^x
1	0,15	0,0437	0,0435	1 : 0,99
2	0,15	0,147	0,054	1 : 3,7
3	0,15	1,47	0,060	1 : 41
4	0,15	0,147+ 1,62 μm P_i	0,047	1 : 3,2

^x Nach Gl. 25 sind: μm gebildetes ADP = μm E-S-P.

Es wurde eine hochgereinigte Enzymlösung, die 2175 E/ml und 12,5 mg Protein/ml enthält, verwendet, d.h. in jeden Versuch werden 326 EE und 1,9 mg Protein eingesetzt. Man sieht besonders deutlich aus Versuch 1, daß die Reaktion sehr stark von links nach rechts, d.h. zur E-S-P Bildung hin verschoben ist, denn 99 % des eingesetzten ATP werden in ADP umgewandelt. Bereits ab Versuch 2 wird die innerhalb der Fehlergrenze nach Abb. 7, 326 EE entsprechende ADP-Menge gebildet, also schon bei 3,7 fachen ATP-Überschuß über das Enzym. Bei weiterem 10fachen ATP-Überschuß (Versuch 3) wird die ADP-Bildung nicht mehr wesentlich erhöht. Das gesamte eingesetzte Enzym (ca. 0,06 μm Wirkstellenäquivalente) ist in E-S-P (0,06 μm) umgewandelt worden. Versuch 4 zeigt, daß erst große Mengen von anorganischem Phosphat die Zündreaktion schwach beeinflussen.

Bei einer spezifischen Aktivität von 174 für unser hierfür verwendetes reinstes Enzympräparat, ent-

sprechen 1 mg Protein 174 Enzymeinheiten, bzw. 0,3 mg Protein 53 Fermenteinheiten, die mit 0,01 μ m ATP bei der Zündreaktion reagieren. Daraus ergibt sich für die Glutaminsynthetase, daß 30 000 g Protein ein aktives Zentrum enthalten.

2. Die Enzym-ATP-Verbindung.

Die Gleichungen 19 b und 22 II zeigen die Reaktion des durch die "Zündreaktion" gebildeten Enzymphosphats mit ATP. Dabei wird das an das Enzym über den Schwefel gebundene Phosphat durch ATP verdrängt und es bildet sich die beständige E-ATP-Verbindung, die, wie früher gezeigt wurde (66), nach der Hochspannungselektrophorese unverändert erhalten bleibt.



Wir konnten mit ATP, das in α -Stellung radioaktiv markiert war, die pro Enzymeinheit covalent gebundene ATP-Menge quantitativ bestimmen. Die ATPase, die den konstanten "Gang" in Abb. 7 hervorruft, läßt sich durch Fluoridionen hemmen. Folgende Versuche wurden durchgeführt:

Wir inkubierten Glutaminsynthetase mit ATP ³², Fluorid und schützendem Rinderalbumin 5 Minuten bei +25° C. Dabei soll sich nach Gl. 28.a) die E-S-P-P-P^{*}-A-Verbindung bilden. Zur Trennung des enzymgebundenen ATP vom überschüssigen verwendeten wir eine Säule mit Sephadex G 50, medium. Bei +4° C wurde in kurzer Zeit der Ansatz filtriert, um einer Enzymdenaturierung auf der Säule vorzubeugen. Mit Wasser wurde nachgewaschen. Weder Sephadex G 25 noch Sephadex G 75 eigneten sich

gleich gut zur Trennung des Enzymproteins von den niedermolekularen Substanzen ATP und Phosphat. Die graphische Darstellung eines solchen Versuches zeigt Abb. 8.

*Trennung von
enzymgebundenem
und freiem ATP³²*

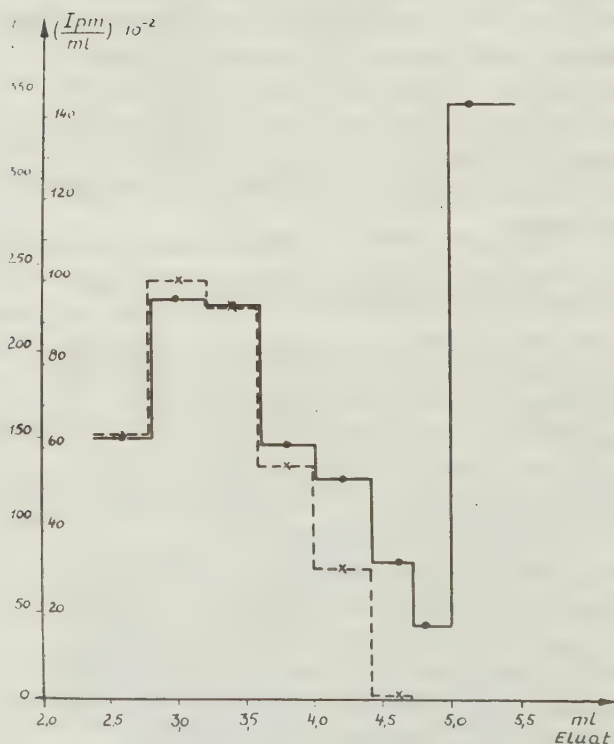


Abb. 8 Trennung von enzymgebundenem und freiem ATP³² durch Sephadex G 50.

Man kann erkennen, daß bis 3,8 ml Eluat die Fermentaktivität (x-x) direkt proportional der ³²P -

Radioaktivität (.-.) ist. Nach 4 ml tritt eine deutliche Diskrepanz auf, die dadurch zu erklären ist, daß das Enzym auf der Säule etwas denaturiert und außerdem bis zur Messung seiner enzymatischen Aktivität (1/2 Stunde nach Beginn des Filtrationsversuches) z.T. inaktiviert wird, sodaß relativ zu wenig Enzymeinheiten gefunden wurden. Auch die ersten Fraktionen, die wir bei + 4° C aufbewahrten, zeigten eine ähnliche Aktivitätsabnahme. So verlor die 153 Fermenteinheiten/ml enthaltende Fraktion während 1 Stunde 17 % und innerhalb 2 1/2 Stunden insgesamt 25 % ihrer enzymatischen Anfangsaktivität. Die zwischen 3,7 und 4,9 ml gemessene Radioaktivität stammt wahrscheinlich von ATP, das von dem durch die Filtration etwas geschädigten Enzymanteil abgespalten wurde. Erst ab 4,9 ml Durchlauf erscheint das im Inkubationsansatz nicht an Enzym gebundene ATP³², das somit einwandfrei vom E-ATP durch Sephadex G 50 getrennt worden ist. Aus dem Verhältnis der Radioaktivität (Ipm) zu den gefundenen Enzymeinheiten läßt sich quantitativ die pro Enzymeinheit gebundene ATP-Menge errechnen. Da die 6160 Ipm/ml der ersten Fraktion 0,028 μ m ATP entsprechen und in dieser 153 Enzymeinheiten/ml gefunden werden, ergibt sich, daß von 55 Enzymeinheiten 0,01 μ m ATP gebunden werden.

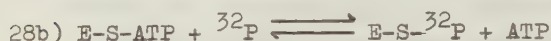
Folgende Tabelle zeigt die Werte der ersten 4 Fraktionen.

Tab. 9

Fraktion	Ipm/ml	μ m ATP/ml	EE/ml	errechnete EE für 0,01 μ m ATP
1	6160	0,028	153	54,6
2	9600	0,044	241	54,7
3	9500	0,043	225	51,3
4	6100	0,027	137	50,7

Der Mittelwert ergibt auch hier, daß 53 Ferment-einheiten 0,01 μM ATP binden.

Um zu beweisen, daß Gl. 28a) eine Gleichgewichtsreaktion ist, inkubierten wir radioaktives anorganisches Phosphat mit ATP und Glutaminsynthetase. Dabei sollte in Umkehr der Gl. 28a) radioaktives Phosphat an das Enzym gebunden werden:



Auch dieses Enzymaddukt konnten wir mit Sephadex G 50 isolieren und quantitativ bestimmen.

Um die Größenordnung der Gleichgewichtskonstanten K_{II} von Gl. 28) zu ermitteln, inkubierten wir mit unterschiedlichen ATP: ${}^{32}\text{P}$ Verhältnissen und bestimmten jeweils die Konzentration an E-P^* .

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- Wir inkubierten 159 Enzymeinheiten (= 0,03 μM) mit 0,1 μM ATP und 0,15 μM ${}^{32}\text{P}$ -Phosphat. Auf einer kleinen Sephadex-G-50-Säule wurde der schnell wandernde Proteinanteil wieder von den später im Eluat erscheinenden niedermolekularen Substanzen getrennt. Die enzymenthaltende Fraktion enthielt 17,2 EE/ml, die 11.000 Ipm gebunden hielten. Aus der gemessenen Radioaktivität schlossen wir auf die Konzentration an E-P^* . Die Konzentration an E-ATP ergab sich aus der Differenz der Gesamtmenge (in μM) und der des Enzymphosphats.

Auswertung zur Bestimmung von K_{II} :

- Errechnen der Konzentration von E-P^* und E-ATP .

17,2 Enzymeinheiten = 0,00325 μM (Wirkstellen-äquivalente).

Da 0,001 μM des verwendeten ${}^{32}\text{P}$ -Phosphats 5000 Ipm gaben, entsprechen 11 000 Ipm ${}^{32}\text{P}$ = 0,0024 μM E-P^* .

E-ATP ergibt sich zu: 0,00325 - 0,0024 = 0,00085 μM .

Daraus erhält man ein $\text{E-ATP/EP-Verhältnis}$ von

$$8,5 \cdot 10^{-4} : 2,4 \cdot 10^{-3} = 1 : 2,9.$$

b. Konzentration von ^{32}P und ATP nach der Inkubation.

Durch die Zündreaktion (Gl. 25) hat ATP von $0,1\mu\text{m}$ auf $0,07\mu\text{m}$ abgenommen und Phosphat auf $0,18\mu\text{m}$ ^{zuge-}_{nommen}. Die Gleichgewichtskonzentration von ATP und P verhält sich also wie $0,07:0,18 = 1 : 2,6$.

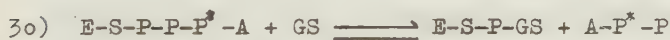
$$c. 29) K_{II} = \frac{[\text{E-ATP}] \times [\text{P}]}{[\text{E-P}] \times [\text{ATP}]}$$

$$K_{II} = \frac{1 \times 2,6}{2,9 \times 1} = 0,866$$

2. In einem zweiten Ansatz betrug das Verhältnis ATP : P = 10 : 1. Bei gleicher Durchführung des Versuchs und analoger Auswertung ergab sich für K_{II} bei E-ATP : E-P^{*} = 7 : 1 ein Wert von 0,7. Aus den Werten für K_{II} ist ersichtlich, daß die Reaktion 28) praktisch keine Energie erfordert.

3.) Die "aktivierte Glutaminsäure".

Nach (66) bildet sich aus E-ATP mit Glutaminsäure die "aktivierte Glutaminsäure".



Da wir in den vorhergehenden Versuchen durch Sephadexfiltration offenbar die E-ATP-Verbindung mit dem in α -Stellung markierten Phosphat isoliert hatten, prüften wir damit durch Zugabe von Glutaminsäure die Richtigkeit der obigen Vorstellung. Dabei wissen wir aus eigenen Erfahrungen und den in der Literatur beschriebenen Beispielen (z.B. 50, 66), daß hierbei Spuren von Ammoniak die Isolierung der "aktivierten Glutaminsäure" unmöglich machen, da sie sofort mit ihr unter Bildung von Glutamin weiterreagieren. Aus diesem Grunde erarbeiteten wir die verschiedenen oben beschriebenen Metho-

den, um den Ammoniak quantitativ entfernen zu können, denn bei einem angenommenen Äquivalentgewicht der Glutaminsynthetase von ca 30 000 genügt theoretisch z.B. bereits 5 γ Ammoniak, um die "aktivierte Glutaminsäure", die von 8,5 mg Enzymprotein gebildet wurde, in das Amid über zu führen. Selbst in Inkubationsansätzen, deren einzelne Lösungen wir mit austauscherbehandeltem bidestillierten Wasser frisch angesetzt hatten und in deren Sephadex-G-25-Filtraten kein Ammoniak mehr nachweisbar war, fanden wir bei kinetischen Messungen noch 0,5 - 4 γ Ammoniak. Die Lösungen wurden außerdem in verschließbaren Kunststoffflaschen aufbewahrt, da mehrere Stunden in verschlossenen Gläsern aufbewahrtes Wasser nesslerpositive Reaktion zeigte. Es läßt sich demnach der Zutritt geringster Spuren Ammoniak nicht vermeiden. Aus diesem Grunde ist es nicht verwunderlich, daß nach Hochspannungselektrophorese bei p_H 8,6 von möglichst ammoniakfreiem Enzym, ATP und ^{14}C -Glutaminsäure (s.S. 16) bisher (66) stets Glutamin gefunden wurde.

Diese Schwierigkeiten treten auf, wenn man im optimalen p_H -Bereich der Glutaminsynthetaseaktivität, um p_H 7,0, arbeitet. Er wird verständlicherweise meist verwendet. Zum Glück konnten wir feststellen, daß die ersten 3 Stufen der enzymatischen Glutaminbildung (Zündreaktion, Bildung von E-ATP und daraus von E-P-GS) auch bei p_H 5,5 rasch ablaufen. Das ist aber ein Bereich, in dem weniger als 1 % des gesamten Ammoniaks als NH_3 vorliegen. Nur letzteres reagiert mit der "aktivierten Glutaminsäure". Deshalb haben wir bei p_H 5,5 die Isolierung der "aktivierten Glutaminsäure" nun endlich ohne die bisherigen Mühen, Ammoniaksuren auszuschließen, durchführen können.

Wir versetzten 0,4 ml des zwischen 2,5 und 3,7 ml aufgefangenen Sephadexfiltrates, die die E-ATP-Verbindung mit ^{32}P im α -Phosphat enthielten (Abb. 8) in Gegenwart von Citratpuffer p_H 5,5 und Fluorid mit L-Glutamat. Nach 5 Minuten Inkubation bei 25°C filtrierten wir den 70 EE und 3150 Ipm enthaltenden Ansatz durch eine kleine Sephadex-G-50-Säule. Die Fraktionen zwischen 2,6 und 4,6 ml enthielten die Glutaminsynthetase. (s. Abb. 9)

*Isolierung der
'aktivierten Glutaminsäure'*

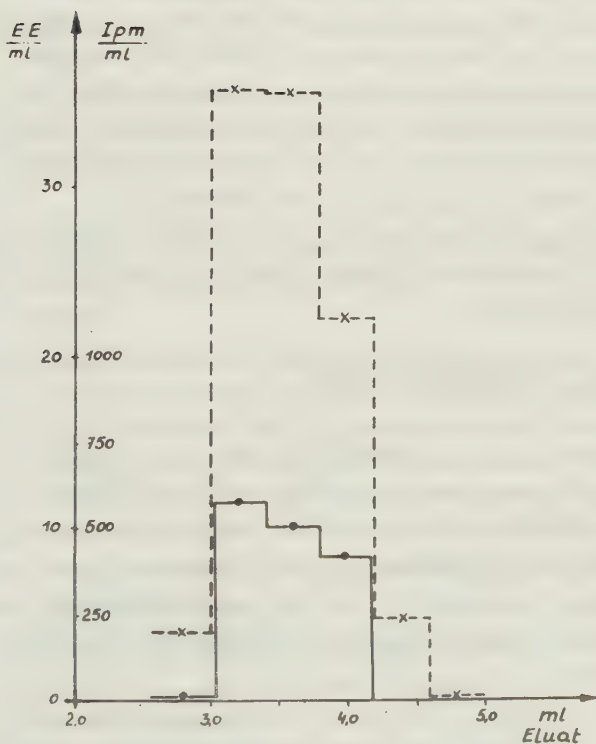


Abb. 9

Insgesamt wurden 41 EE ($= 0,79 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ Wirkstellen) wiedergefunden, die 604 Ipm enthielten. Diese Radioaktivität entspricht $0,27 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ E-ATP*. Es waren demnach bei einem Verhältnis von $0,79 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ Wirkstellen: $0,27 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ E-ATP* 2 Drittel frei von Radioaktivität. Sie könnten die E-P-GS-Verbindung sein. Um das zu beweisen, wurde ein Teil des Filtrats (Fraktion B) mit etwas konzentriertem Ammoniak und ein anderer Teil (Fraktion B₂) mit m/10 ADP-Lösung versetzt. Die Filtrate wurden gefriergetrocknet und ihre Rückstände in wenig Wasser aufgenommen. Nach Hochspannungselektrophorese bei p_H 6,5 wurden sie durch Besprühen mit Ninhydrin entwickelt. Die Fraktion B zeigte nur eine Glutamin-B₂ ausschließlich die Glutaminsäurebande. In den späteren Fraktionen der Säule wurde die restliche Radioaktivität wiedergefunden. Sie war, wie wir durch Papierelektrophorese bei p_H 4,2 in Citratpuffer feststellten, hauptsächlich im ADP enthalten. Glutamin war im gesamten Nachlauf nicht nachweisbar.

Aus den obigen Daten versuchten wir die Größenordnung der Gleichgewichtskonstanten K_{III} von Gleichung 30) zu bestimmen:

$$40) \quad K_{III} = \frac{[E-P-GS] \times [ADP]}{[E-ATP] \times [GS]}$$

Die Konzentration an E-ATP* im Eluat betrug $0,27 \times 10^{-2} \mu\text{m}$, die des E-P-GS $0,52 \times 10^{-2} \mu\text{m}$. Das entspricht einem Verhältnis von 1:2.

2 Drittel der eingesetzten $0,013 \mu\text{m}$ E-ATP waren nach obigen Messungen in E-P-GS umgewandelt worden. Dabei wurden äquivalente Mengen ADP frei, d.h. $0,0086 \mu\text{m}$.

Von den $0,2 \mu\text{m}$ GS sind $0,52 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ als "aktivier-
te Glutaminsäure" eingebaut worden. Es bleibt ein
Rest von $0,1978 \mu\text{m}$,
 $0,0086 : 0,1978 \cong 9 : 200$

$$K_{III} = \frac{2}{1} \times \frac{9}{200} \cong 10^{-1}$$

4. Die Glutaminbildung.

Nach Gl. 22_{IV} reagiert die "aktivierte Glutaminsäure"
mit Ammoniak, wobei Glutamin entsteht und das En-
zym-S-Phosphat zurückgebildet wird:



Nach A. Meister (87) ist die Gleichgewichtskonstan-
te K für die Gesamtreaktion der Glutaminbildung
(Gl. 23a) $= 1,2 \times 10^3$.

Da $K_I + K_{II} + K_{III} \approx 10^3$ nach unseren bisherigen
Bestimmungen betragen, läßt sich für die Gleichge-
wichtskonstante K_{IV} für Gl. 41 ein Wert von ca. 1
abschätzen.

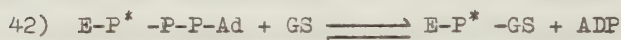
Diesen Untersuchungen über den Wirkungsmechanis-
mus der Glutaminsynthetase ging eine Serie mit γ -
und β, γ -markiertem ATP als orientierende Vorver-
suche voraus. Wir konnten damit Erfahrungen über
die Trennmöglichkeiten des Enzyms von den nieder-
molekularen Substanzen auf Säulen unterschiedlicher
Größe, die mit verschiedenen Sephadexsorten gefüllt
waren, sammeln.

Wir inkubierten jeweils Enzym und Trispuffer (m/10,
 $\text{pH } 7,2$) mit ATP^* , oder Enzym, Trispuffer, ATP^*
und Glutaminsäure, um die E-ATP-Verbindung oder
die "aktivierte Glutaminsäure" nach Filtration über
Sephadex nachzuweisen. Dabei zeigte sich, daß ein
Teil des β, γ -markierten ATP, der zur Reinigung in
Pyridin-Acetatpuffer elektrophoriert worden ist,
unbrauchbar war.

In einem der durchgeführten Versuche inkubierten wir 260 EE (= 0,05 μ m) mit 1,1 μ m γ -markiertem ATP³², das eine Radioaktivität von 1 942 020 Ipm hatte. Nach Sephadexfiltration fanden wir insgesamt 44 EE (= 0,0084 μ m), die 13 400 Ipm (= 0,0075 μ m) gebunden hielten. Das entspricht 58 EE, die sich mit 0,01 μ m ATP verbinden. Das überschüssige ATP erschien in späteren Fraktionen.

Wir verwendeten eine relativ lange Säule (17 x 260 mm), sodaß die Filtration über eine Stunde in Anspruch nahm. Das erklärt den verhältnismäßig hohen Enzymverlust in dieser Zeit.

Zum Eluat gaben wir 25 μ m GS. Dabei entstehen nach:



radioaktives Enzymphosphat und unmarkiertes ADP. Diesen Ansatz trennten wir durch eine kleine Sephadexsäule (10 x 100 mm). In den Eluaten konnte mit dem optischen Test wegen zu großer Verdünnung des Enzyms keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden, aber die gemessene Radioaktivität lag in den Fraktionen, die auch eine erhöhte Extinktion bei 280 m μ zeigten.

B. III. Diskussion.

Die früher von Th. Wieland u.a. (66) vorgeschlagene Hypothese über den Reaktionsmechanismus der enzymatischen Synthese des Glutamins konnte durch die von uns angewendeten neuen Methoden bewiesen werden. Durch den Nachweis einer der Enzymmenge äquivalenten Bildung von ADP bei ATP-Zusatz, wobei das Enzym durch das terminale Phosphat phosphoryliert wird, konnten wir die "Zündreaktion" bestätigen. Die dabei auftretende ATPase-Wirkung scheint eine Enzymeigen-

schaft zu sein. Selbst hochgereinigte Enzympräparate zeigen im optischen Test einen, wenn auch äußerst langsamen Gang (s.S.20). Diese geringe ATPase-Wirkung bleibt bei Reinigung des Enzyms weitgehend unbeeinflusst. Sie läßt sich durch Fluoridionen hemmen. Boyer fand ebenfalls schwache ATPase-Aktivität der Glutaminsynthetase (59).

Nach Zusatz von radioaktivem ATP zum phosphorylierten Enzym konnte durch einen Vergleich der Enzymaktivität und der am Enzym gebundenen Radioaktivität, nach Filtration über Sephadex G 50, die pro Enzymeinheiten gebundene ATP-Menge quantitativ bestimmt werden. Diese Reaktion, durch die das ATP an das Enzym gebunden wird, besteht in einem Acyl-austausch an der Wirkgruppe des Enzyms, wobei das über den Schwefel an das Enzym gebundene Phosphat vom ATP verdrängt wird. Durch solchen Austausch zwischen S-Phosphat und ATP findet die feste Bindung des ATP an das Enzym ihre Erklärung (66).
mit L-Glutamat erfolgt unter Abspaltung von ADP aus der E-S-ATP-Verbindung eine Verknüpfung mit dem γ -Carboxyl. Ist das ATP der E-S-ATP-Verbindung in α -Stellung radioaktiv markiert, so findet man nach Gl. 30 radioaktives ADP, während die Fraktionen, die nach Sephadex-G-50-Filtration das Enzym enthalten, keine Radioaktivität aufweisen. Mit γ -markiertem ATP³² wird inaktives ADP abgespalten, während am Enzym Radioaktivität nachweisbar ist (Gl. 42). Die "aktive Glutaminsäure" ist demnach γ -Glutamylphosphat, dessen Phosphatrest covalent mit dem Enzym verbunden ist. Mit Ammoniak reagiert sie zu Glutamin weiter, wobei das Enzymphosphat zurückgebildet wird.

Die von A. Meister u.a. publizierten Ergebnisse (62, 63), wonach, wie oben bereits erwähnt, die Bindung der Glutaminsäure an das Enzym in Anwesenheit von Mg^{++} unter Spaltung von ATP ohne Ammoniak

vor sich geht, wobei ein γ -carboxyl-aktiviertes Glutamat gebildet wird, bestätigen unseren Vorschlag über den Mechanismus der Glutaminbildung.

Durch die Anwendung von Sephadex ist es uns gelungen, die "aktivierte Glutaminsäure" zum ersten Mal zu isolieren. Man sollte erwägen, diese gute Brauchbarkeit von Sephadex zur Isolierung enzymgebundener Zwischenprodukte bei der Aufklärung anderer Reaktionsmechanismen, deren aktivierte Zwischenstufen bisher mit keiner Methode direkt nachweisbar waren, auszunutzen.

C. Experimenteller Teil.

I. Der optische Test zur Bestimmung der Aktivität der Glutaminsynthetase.

Puffer, Substrate und Enzyme:

Trispuffer, reinst, wurde vom Serva-Entwicklungs-
labor, Heidelberg bezogen.

Phosphoenolbrenztraubensäure als Silber-Bariumsalz, DPNH reinst, (85 %ig) und Pyruvatkinase (Kristall-suspension) wurden von der Fa. C.F.Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof geliefert.

Milchsäuredehydrogenase: wurde kristallisiert nach
einer modifizierten Methode
von S t r a u b (55) aus
Schweineherzmuskel.

Dinatriumsalz der Adenosintriphosphorsäure: Präparat
der Fa. Sigma, Chemical
Company, USA.

L-Glutaminsäure: Präparat der Deutschen Hoffmann-La
Roche AG, Grenzach,

Testzusammensetzung:

2,7 ml 0,1 m Trispuffer p_H 7,4
0,08 ml PBTS ($1,6 \cdot 10^{-6}$ Mol)
0,1 ml 0,5 m $MgSO_4$ ($5 \cdot 10^{-5}$ Mol)
0,1 ml 2 m KCl ($2 \cdot 10^{-4}$ Mol)
0,1 ml 0,1 m ATP ($1 \cdot 10^{-5}$ Mol)
0,03 ml m NH_4Cl ($3 \cdot 10^{-5}$ Mol)
0,06 ml DPNH ($8 \cdot 10^{-7}$ Mol)
0,02 ml LDH
0,02 ml PK
0,02 ml Glutaminsynthetase
0,25 ml 0,1 m L-Glutaminsäure ($2,5 \cdot 10^{-5}$ Mol.)

Die Messungen werden im Photometer "Eppendorf" bei $366\text{ m}\mu$ in einer Rundkuvette mit der Schichtdicke 1 cm durchgeführt.

Nach Zugabe aller Komponenten außer Glutaminsäure wird zunächst der durch die Verunreinigungen hervorgerufene Gang gemessen (Extinktionsabnahme um 0,1 in der Zeit t_0) und dann die Glutaminbildung durch Zugabe von L-Glutamat ausgelöst (Extinktionsabnahme um 0,1 in der Zeit t_1). Nach Gl. 24 werden mit t_0 und t_1 und dem entsprechenden Testvolumen 2 Werte errechnet. Ihre Differenz ergibt die Enzymeinheiten/ml Enzymlösung.

Bei hochgereinigten Enzympräparaten liegt der errechnete Wert für den Blindwert t_0 unter 0,5 % der Gesamtenzymeinheiten und kann vernachlässigt werden.

II. Isolierung der Glutaminsynthetase.

Stufe 1 - 5 nach (40).

1. Stufe: Extraktion.

2,25 kg Erbsenmehl von grünen Schalerbsen "Vorbote" (Nr. 1740 - 3, bezogen von der Fa. Garvens, Hannover), werden 30 Minuten mit 18,8 Liter 0,1 m NaHCO_3 -Lösung bei 0° gerührt. Anschließend werden 483 ml 2 m Magnesiumsulfatlösung zugefügt, 5 Minuten weiterrühren und den Niederschlag über Nacht bei 0° absetzen lassen. Das gelbe Supernat wird vorsichtig dekantiert, der restliche Niederschlag bei 3 000 U/Min. in 25 Minuten zentrifugiert und die beiden Überstände vereinigt.

Extraktvolumen: 17,3 Liter

Protein: 8,48 mg/ml

Enzymeinheiten: werden erst ab 2. Stufe getestet.

2. Stufe: I. Ammonsulfatfällung.

17,3 Liter Extrakt (p_H 7,3) werden mit 1070 ml m KH_2PO_4 auf p_H 6,5 eingestellt. Unter Rühren werden 5190 g Ammonsulfat (300 g/Liter Extrakt) hinzugegeben. Der Niederschlag bleibt über Nacht bei 0° stehen. Das Supernat wird dekantiert und verworfen, die restliche Suspension zentrifugiert (3000 U/Min) und der Niederschlag in 750 ml aqua bidest. aufgenommen. Diese Lösung wird mit 2 m K_2HPO_4 auf p_H 7,2 eingestellt und im Cellophanschlauch zweimal gegen je 8 Liter aqua bidest. bei 0° 34 Stunden dialysiert. Endvolumen nach der Dialyse: 1340 ml

Protein: 28,9 mg/ml

Enzymeinheiten: 39 Einheiten/ml

Spezifische Aktivität: 1,4

3. Stufe: Protaminsulfatfällung.

Der dialysierte Extrakt wird mit einer Lösung von 2 %igem Protaminsulfat solange behandelt, bis eine kleine zentrifugierte Probe bei weiterer Protaminsulfatzugabe keinen Niederschlag mehr bildet. Es werden 390 ml Protaminsulfatlösung benötigt. Diese Behandlung entfernt einen Hemmstoff. Der inaktive Niederschlag wird abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit weiter verwendet.

Extraktvolumen: 1700 ml

Protein: 14,6 mg/ml

Enzymeinheiten: 30 Einheiten/ml

Spezifische Aktivität: 2,06

4. Stufe: I. Nucleinsäurefällung.

Das Enzym wird mit Hefenucleinsäure bei p_H 5 vollständig gefällt. Dazu werden 1700 ml Extrakt bei 0° mit 35 ml n Essigsäure auf p_H 5,1 eingestellt und anschließend wird unter Rühren 2%ige Kalium-

nucleatlösung zugegeben. nach 146 ml Nucleinsäurezugabe war nahezu keine Aktivität mehr im Überstand nach Zentrifugieren einer Probe zu messen. Die Fällung bleibt 1 1/2 Stunden bei 0° stehen, wird in der Kühlzentrifuge abgetrennt und der Niederschlag in 90 ml aqua bidest. aufgenommen. Mit m K_2HPO_4 wird auf p_H 7,3 neutralisiert. Nach 15 Minuten Extraktion wird die Suspension abzentrifugiert.

Extraktvolumen: 90 ml

Protein: 15,8 mg/ml

Enzymeinheiten: 311 Einheiten/ml

Spezifische Aktivität: 19,7

5. Stufe: II. Ammonsulfatfällung.

90 ml Enzymlösung werden mit 3,6 ml m Phosphatpuffer p_H 7,3 versetzt und anschließend mit 64,8 ml gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt. Nach 15 Minuten wird der inaktive Niederschlag durch Abzentrifugieren entfernt und der Überstand mit weiteren 54 ml gesättigter Ammonsulfatlösung verrührt. Nach 1 Stunde Nachsättigung wird der Ammonsulfatniederschlag abzentrifugiert und in 18 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,2 aufgenommen. Das Enzym wird bei -15° aufbewahrt.

Extraktvolumen: 18 ml

Protein: 18,7 mg/ml

Enzymeinheiten: 1225 Einheiten/ml

Spezifische Aktivität: 65,5

6. Stufe: Fraktionierte Ammonsulfatfällung.

Zu 18 ml Enzymlösung (0,44 m an Ammonsulfat) werden 3,8 ml gesättigte Ammonsulfatlösung bei 0-3° zugegeben. Dabei tritt erste Trübung auf. Nach einer Stunde wird der Niederschlag bei 10 000 U/Min.

abzentrifugiert und in 7 ml m/10 Phosphatpuffer p_H 7,2 aufgenommen. Da dieser Niederschlag nur $1/6$ der Gesamtenzymaktivität enthält, werden zum Zentrifugat (1,04 m an Ammonsulfat) je 3,8 ml (Ammonsulfatmolarität im Überstand 1,47) und 4,7 ml (AS.-molarität 1,85) gesättigte Ammonsulfatlösung nacheinander zugegeben. Der letzte Niederschlag enthält die Hauptaktivität und wird in 5 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,2 aufgenommen.

Endvolumen: 5 ml

Protein: 22 mg/ml

Enzymeinheiten: 2480 Einheiten/ml

Spezifische Aktivität: 113

7. Stufe: Calciumphosphatgelbehandlung.

Die Darstellung des Gels erfolgte nach D. K e i - l i n und E. F. H a r t r e e (72).

Das Trockengewicht des verwendeten Gels betrug 25,5 mg/ml.

4 ml Enzymlösung werden $5\frac{1}{2}$ Stunden gegen aqua bidest. bei 0° dialysiert. Dabei verliert das Enzym $2/3$ seiner Anfangsaktivität. Das denaturierte Protein wird abzentrifugiert und die Lösung mit m/20 Trispuffer p_H 7,2 auf 20 ml aufgefüllt. Bei 0° werden die in Tab. 1 aufgeführten Gelmengen zugegeben. Nach jeder Gelzugabe wird 10 Min. "geplümpert", das Gel abzentrifugiert und nach Aktivitätsmessung und Proteinbestimmung im Überstand weiteres Gel zugegeben.

Die Elution des Enzyms geschah in analoger Weise. Zu den letzten beiden vereinigten Gelfraktionen wurden je 14 ml m/30, m/10 und m/2 Phosphatpuffer p_H 7,2 bei 0° zugegeben, jedesmal wird 10 Min. gerührt und der Überstand abzentrifugiert. Im

letzten Überstand befindet sich die Hauptmenge des Enzyms. Mit gesättigter Ammonsulfatlösung wird die Glutaminsynthetase aus dem großen Volumen ausgefällt und in 1 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,2 aufgenommen.

Säulenchromatographie.

CM-Cellulose wurde vom Serva - Entwicklungslabor, Heidelberg bezogen.

Der Austauscher besitzt, in aqua bidest. gelöst, einen p_H -Wert unter 5,5, sodaß mit 0,005 m Phosphatpuffer p_H 6,0 schwer ein konstanter Wert eingestellt werden kann. Man suspendiert daher den Austauscher in 0,05 m Phosphatpuffer p_H 6,0 und entfernt zunächst durch mehrfaches Aufschlämmen und Dekantieren die feinsten Zelluloseeteilchen, die leicht die Säule verstopfen und damit die Durchflußgeschwindigkeit verändern. Hat sich auch jetzt noch der p_H - Wert verschoben, wird er mit NaH_2PO_4 nachgestellt. Durch Anlegen eines Vakuums wird der Austauscher entgast und in Breiform in die Säule gefüllt, die unten eine grobe Fritte besitzt. Im Kühlraum läßt man die Säule auf $+ 3^\circ$ abkühlen und wäscht sie über Nacht mit 0,005 m Phosphatpuffer p_H 6,0. Nach E. P e t e r s o n und H. S o b e r (75) werden für 64 mg Protein 2 g Austauscher benötigt. Wir verwendeten für 52 mg Protein 2 g trockenen Austauscher.

Das Regenerieren der CM - Cellulose erfolgte mit 1 n Natronlauge und anschließendem Nachwaschen mit Puffer.

III. Mikromethode zur Bestimmung von Proteinen.

Reagenzien:

$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5%ige wässrige Lösung (w.L.)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	4% w.L.
TCE	10% w.L.

d = 2 cm, Hg 546 m μ Photometer Eppendorf.

Das Protein der zu messenden Proben fällt man mit TCE und zentrifugiert 10 Min. bei 3000 U/Min. ab. Der Überstand wird verworfen und die Gläser werden ausgetrocknet. Den Niederschlag löst man in 5 ml Na_3PO_4 und gibt 0,5 ml CuSO_4 hinzu. Man verrührt gut und läßt die Proben 30 Min. bei Zimmertemperatur wieder unter Rühren inkubieren. Das überschüssige Kupfer wird als Kupfersulfat gefällt und 10 Min. bei 3000 U/Min. abzentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wird im Photometer Eppendorf gelesen.

IV. Mikromethode zur Bestimmung von Ammoniak.

d = 2 cm, V = 5 ml, Hg 436 m μ Photometer Eppendorf, Nessler's Reagenz (Merck 9011 und 9012, 1:1 gemischt, und 1:50 verdünnt).

In dickwandige Reagenzgläser mit Schliffaufsatz pipettiert man die zu messende Lösung und soviel durch Kationen- und Anionenaustauscher gereinigtes Wasser, daß mit 4 ml Nessler's Reagenz ein Volumen von 5 ml erreicht wird. Dazu gibt man 4 ml einer frisch angesetzten Nessler-Lösung und verschließt die Gläser sofort nach dem Pipettieren. Nach Umschütteln läßt man 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubieren und mißt die Extinktion im Photometer Eppendorf.

Eichsubstanz: über Phosphorpentoxyd getrocknetes
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

V. Quantitative Entfernung von A⁺ Ioniumionen.

1.) Durch den Kationenaustauscher Amberlite IRC 50 (78)

Säule: 10 x 100 mm

Harz: Amberlite IRC 50, Kationenaustauscher, H-Form,

Kapazität: 34 g CaCO_3 /L Harz

Der Austauscher wird solange mit 5 n NaOH behandelt, bis der pH -Wert 8 konstant bleibt. Nach wiederholtem Waschen mit H_2O dest. wird das Harz mit 0,01 m Phosphatpuffer pH 7,7 verrührt und in die Säule gefüllt. Sie wird vor Extraktzugabe 4 x mit Phosphatpuffer gewaschen.

2.) Durch Sephadex G 25.

Sephadex wird mit 0,05 m NaCl-Lösung einige Stunden zum Quellen stehen gelassen. Nachdem der Überstand mit nicht abgesetzten feinen Gelpartikeln vorsichtig abgegossen worden ist, wird die Suspension als dicker Brei kontinuierlich in eine Säule (20 x 150 mm) (mit Fritte) gegossen. Man erhält so eine gleichmäßige Säule, frei von Zonen. Man kann auch die Säule vorher mit Wasser füllen und durch einen Trichter die Suspension zugeben. Die Partikel sedimentieren langsam und gleichmäßig. Nachdem sich eine Lage von einigen Zentimetern gebildet hat, öffnet man den Hahn der Säule und läßt das Wasser langsam heraustropfen. Sind alle Gelkörner sedimentiert, wird oben auf die Säule ein kleines Stück Filterpapier gelegt, um ein Aufwirbeln zu vermeiden. Bei 0°C werden 2 ml der Enzymlösung dazugegeben. Man wäscht mit aqua bidest. nach und

eluiert mit einer Tropfgeschwindigkeit von 4,5 ml/5 Min.

Folgende Tabelle zeigt den Gehalt an Glutaminsynthetase, Ammoniak und Protein in den einzelnen Eluat.

Fraktion	2	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15
ml Eluat	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
ml gesamt	9	18	22,5	27	31,5	36	40,5	45	49,5	58,5	67,5
Enzymeinheit/ml	-	-	174	174	9,5	3	0,5	-	-	-	-
Ammoniak-N [g]/ml	-	-	-	-	0,4	5,9	5	5	53	5,9	-
mg Prot./ml	-	-	1	1,1	0,7	0,6	0,7	0,5	0,03	-	-

Tab. 10

3.) Zum Ultrafiltrieren bei 15atü benutzten wir das Ultrafiltergerät der Membranfiltergesellschaft Cöttingen mit dem Ultrafilter Lösung 60.

VI. Verdauung der Glutaminsynthetase mit RNase.

2 Ansätze a und b mit je:

1,5 ml m/10 Trispuffer p_H 7,2

0,1 ml Glutaminsynthetase.

Zu a) wird eine kleine Spatelspitze RNase gegeben.

Beide Ansätze läßt man 20 Min. bei Zimmertemperatur inkubieren. Mit je 0,32 ml werden Aktivitätsteste durchgeführt, zum Rest gibt man je:

0,4 ml m/2 $MgSO_4$

0,4 ml m/40 ATP

0,75 ml m/10 GS

0,1 ml m NH_4Cl

Nach 1 Stunde Inkubation bei Zimmertemperatur werden die Lösungen 5 Min. im kochenden Wasser-

bad erhitzt, vom denaturierten Protein abzentrifugiert und gefriergetrocknet. Zum Glutaminnachweis elektrophoriert man 2 1/2 Stunden in Pyridin-Eisessig p_H 5,0.

Vorversuch:

Hefenucleinsäure wird mit RNase verdaut und dann 1 - 30 Stunden gegen Wasser dialysiert. Erst nach 20 Stunden Dialyse war keine weitere RNS-Abnahme im Dialysat zu verzeichnen.

Bestimmung der Ribonucleinsäure durch den Orcin-Test (84).

VII. Hochspannungselektrophorese.

Methodik nach Th. Wieland, G. Pfeleiderer u.a.
(88, 89, 90).

Papier: Schleicher & Schüll 2043 a und 2043b.

Puffer: 1. Pyridin-Eisessig p_H 6,5

4450 ml Wasser, 500 ml Pyridin, 50 ml Eisessig. 2500 V, 2,5 mA/cm Papierstreifenbreite.

2. Citratpuffer nach Sörensen, p_H 4,0 - 4,2
19,2 g Citronensäure + 200 ml 1 n NaOH für p_H 4,0. Dazu 44 ml n/10 HCL, mit Wasser auf 1L auffüllen.

Nach 1 Stunde Elektrophorese bei 15-17,5 mA erreicht man eine gute Trennung der Adenosin-Nucleotide.

3. Tris-Citratpuffer p_H 8,6.

Entwicklung der Substanzen:

a) AMP, ADP, ATP und anorganisches Phosphat.

Das getrocknete Papier wird mit Phosphatreagens (5 ml 6%ige Überchlorsäure, 10 ml n HCL, 25 ml 4 %ige Ammoniummolybdatlösung vermischen, mit

Wasser auf 100 ml auffüllen) besprüht, bei 90° ~~kurz~~ getrocknet und darauf in eine H_2S -Atmosphäre gebracht. In den Phosphathaltigen Banden tritt Blaufärbung auf.

Durch UV-Bestrahlung an Stelle der H_2S -Behandlung können die phosphathaltigen Flecke ebenfalls sichtbar gemacht werden.

b) Aminosäuren und Peptide.

Nach Besprühen mit Ninhydrinreagens (0,5 g Ninhydrin in 300 ml Methanol, 175 ml n Butanol und 15 ml 2 n Essigsäure) läßt man ca 7 Minuten im Trockenschrank bei 100° entwickeln. Es bilden sich rötliche - violette Flecke.

c) Proteinbanden.

Sie werden durch längeres Eintauchen in Amidoschwarz entwickelt.

Amidoschwarz: 800 ml Methanol und 200 ml Eisessig,
gesättigt an Amidoschwarz 10 B.

Waschwasser: 600 ml Methanol, 20 ml Eisessig,
200 ml Wasser.

VIII. Darstellung von radioaktiv-markiertem ATP^{32} .

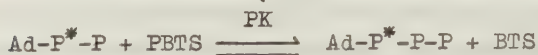
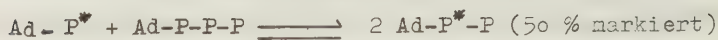
1. α -markiertes ATP^{32} .

Es wurde freundlicherweise von Herrn K. Scholz hergestellt (91).

Isopropylidenadenosin wird in abs. Dimethylformamid gelöst und Triäthylamin als Base zugegeben. Hinzu wird radioaktives $^{32}POCl_3$ (bezogen vom Radiochemical Centre Amersham/England) gefügt. Über Döx 1 wird chromatographiert, mit 1 n Ameisensäure eluiert. Das Eluat wird auf 4 n verstärkt und 1 Tag stehen gelassen. Diese, das radioaktive AMP enthaltende Lösung, wird gefrieretrocknet. Durch die Myokinase-reaktion wird ADP gebildet, das

anschließend mit PBTS zu ATP phosphoryliert wird.

Myokinase



Nach Gefrier-trocknung und Elektrophorese kann das α -markierte ATP eluiert werden.

2. γ -markiertes ATP³²

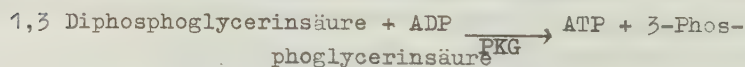
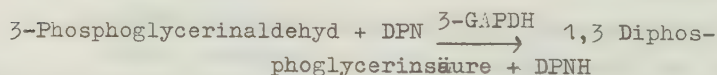
Prinzip und Beschreibung der Darstellung: G.Pfleiderer. (92).

Es sollen daher hier nur kurz die enzymatischen Reaktionen der Darstellung erwähnt werden.

Die Präparate wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim-Waldhof bezogen.

³²P: Trägerfreie Lösung von H₃³²PO₄ in verdünnter Salzsäure, p_H 2-3. Präparat des Radiochemical Centre Amersham/England.

In Gegenwart von 3-Phosphoglycerinaldehyd, DPN und der 3-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase (GAPDH) wird radioaktives anorganisches Phosphat in die 1,3-Diphosphoglycerinsäure übergeführt. Aus diesem energiereichen Phosphorsäureanhydrid wird das Phosphat durch Phosphoglyceratkinase (PGK) in Gegenwart von Mg⁺⁺ auf ADP übertragen, sodaß sich in γ -Stellung markiertes ATP³² bildet.



Vorher wurde der Trioseester, da er nicht sehr haltbar ist, aus Fructose-1,6-Diphosphat mit kristallisierter Aldolase hergestellt.

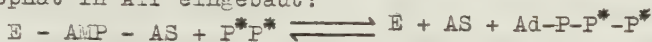
3. β - γ -markiertes ATP³²

Herr H. Rauchfuß stellte uns β - γ -markiertes ATP³² mit aminosäureaktivierendem Enzym her.

Aminosäureaktivierung:



In Umkehr dieser Reaktion wird radioaktives Pyrophosphat in ATP eingebaut:



Der Inkubationsansatz wird enteiweißt, gefriergetrocknet und zur Isolierung des ATP mit Pyridin-Acetatpuffer p_H 6,5 und später mit Citrat-HCl-Puffer p_H 4,2 elektrophoriert.

IX. Messung der Radioaktivität.

1. Lösungen

Die zu messenden Lösungen werden in Aluminiumschälchen pipettiert, eingetrocknet und anschließend im Methangasdurchflußzähler der Fa. Priesseke und Hoepfner ausgezählt.

2. Pherogramme.

Das Pherogramm wird in 2 cm breite Streifen geschnitten. Sie werden in einem kleinen Gerät[†], das mit einem Geiger-Müller-Zählrohr versehen ist, mit konstanter Geschwindigkeit vor einem Spalt vorbeigezogen. Ein automatischer Schreiber läuft synchron mit dem Papiervorschub und registriert die gemessenen Werte.

[†] (Gebaut von Herrn Dr. M. Wilk, Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt/M.)

X. Messung des während der Zündreaktion gebildeten ADP durch den optischen Test.

a. Bestimmung des ADP bei verschiedenen Enzymmen:ien.

Versuch I.

Zunächst inkubiert man die Substanzen des Testansatzes ohne Enzymlösung. Wenn keine Extinktionsabnahme mehr zu messen ist, wird die ADP-Bildung durch Enzymzugabe ausgelöst. Es wird solange gemessen, bis die Extinktionsabnahme/Minute einen konstanten Wert erreicht hat. Alle Versuche werden bei + 20°C durchgeführt.

Testansatz:

2,60 ml m/10 Trispuffer p_H 7,2

0,1 " Mg⁺⁺

0,1 " K⁺

0,08 " PBTS

0,06 " DPNH

0,02 " LDH

0,02 " MK

0,02 " PK

0,01 " ATP

	E	t(Min.)	Δ E
3,01 ml	0,896	0	
0,3 " <u>Enzym</u>	0,922	0	
3,31 ml	0,895	20"	27
	0,847	1	43
	0,815	2	32
	0,783	3	32
	0,756	4	27
	0,732	5	24
	0,705	6	27
	0,681	7	24
	0,657	8	24

Der Extinktionswert zur Zeit t₀ nach Enzymzugabe wurde bei dieser und allen folgenden Messungen er-

rechnet. Dabei ging die Verdünnung des Küvettenvolumens durch Zugabe der jeweiligen Enzymmenge und die Eigenextinktion der Enzymlösung

($E = 0,0355/0,1 \text{ ml Enzymlösung}/3,34 \text{ ml Gesamtvolumen}$, bzw.

$E = 0,0358/0,1 \text{ ml " } /3,31 \text{ ml " usw.)$

in die Rechnung mit ein.

Die reobildete ADP-Menge errechnet sich nach:

$$\frac{(\Delta E - \text{Gang}) \times (\text{Küvettenvolumen})}{3,33 \times 10^6} = \text{M ADP}$$

d.h. für obige Messung:

$$\frac{(0,2174 - (6 \times 0,024) \times 3,31)}{3,33} = 0,0734 \mu\text{m ADP}$$

Versuch II.

2,7 ml 1/10 Trispuffer pH 7,2

0,1 " Mg^{++}

0,1 " K^+

0,05" DPNH

0,08" PBTS

0,02" LDH

0,02" PK

0,02" MK

0,01" ATP	E	T (Min.)	ΔE
3,11 ml	0,857		
0,2 ml <u>Enzym</u>	0,877	0	
3,31 ml	0,857	20"	20
	0,828	1	29
	0,803	2	25
	0,783	3	20
	0,762	4	21
	0,746	5	16
	0,729	6	17
	0,710	7	19
	0,693	8	17
	0,674	9	19

$$[\text{ADP}] = 0,040 \mu\text{m}$$

Versuch III

2,7 ml m/10 Trispuffer p_H 7,2

0,1 " Mg^{++}

0,1 " K^+

0,08" PBTS

0,07" DPNH

0,02" LDH

0,02" PK

0,02" MK

0,03"	ATP	E	t(Min.)	ΔE
3,14 ml		0,936		
0,2 ml	<u>Enzym</u>	0,951	0	
3,34 ml		0,908	20"	43
		0,882	1	26
		0,861	2	21
		0,832	3	29
		0,809	4	23
		0,785	5	24
		0,762	6	23
		0,737	7	25

[ADE] = 0,046 μm

Versuch IV

2,5 ml m/10 Trispuffer p_H 7,2

0,1 " Mg⁺⁺

0,1 " K⁺

0,08" PBTS

0,07" DPNH

0,02" LDH

0,02" PK

0,02" MK

0,03" ATP	E	t (Min)	Δ E
2,24 ml	0,896		
0,1 ml <u>Enzym</u>	0,905	0	
3,34 ml	0,888	20"	17
	0,875	1	13
	0,860	2	15
	0,850	3	10
	0,837	4	13
	0,824	5	13
	0,811	6	13

[ADP] = 0,016 μm

Versuch V

2,5 ml m/10 Trispuffer p_H 7,2

0,1 " Mg⁺⁺

0,1 " K⁺

0,08" PBTS

0,02" LDH

0,02" PK

0,06" DPNH

0,02" MK

0,1 "	ATP	E	t(Min.)	Δ E
<u>3,0α ml</u>		0,665		
0,1 ml	<u>Enzym</u>	0,681	0	
3,1 ml		0,673		
		0,650	1	31
		0,635	2	15
		0,623	3	12
		0,611	4	12
		0,600	5	11
		0,590	6	10
		0,579	7	11
		0,569	8	10

[ADP] = 0,028 μm

Versuch VI

2,5 ml m/10 Trispuffer p_H 7,2

0,1 " Mg^{++}

0,1 " K^+

0,08" PBTS

0,02" LDH

0,02" PK

0,06" DPNH

0,15" m/10 Phosphatp. p_H 7,3 E t(Min) ΔE

3,03 ml

0,1 " Enzym 0,930

3,13 ml

0,1 ml ATP

0,902 0

3,23 ml

0,860 42

0,725 30" 135

0,662 1 63

0,592 2 70

0,554 3 38

0,529 4 25

0,513 5 16

0,499 6 14

0,488 7 11

0,479 8 9

0,469 9 10

[ADP] = 0,02 μ m

b) Bestimmung des ADP bei verschiedenen ATP-Mengen.

Zusammensetzung der Testlösung wie bei a).

Endvolumen stets 3,22 ml, d.h. bei Einsatz verschiedener ATP-Mengen entsprechend weniger Pufferlösung.

Nach unseren bisherigen Abschätzungen läßt sich für K_I ein Wert von ca 10^3 berechnen.

XI. Nachweis der E-ATP-Verbindung mit radioaktivem ATP³².

Ansatz:

0,4 ml in Trispuffer p_H 7,2 aufbewahrtes Enzym:
 760 EE, (= 0,143 μ m E-SH nach X)
 0,1 " d-markiertes ATP³², 1,85 μ m (0,01 μ m = 220 Ipm).
 0,05" m NaF
 50 mg Rinderalbumin

Man inkubiert 5 Minuten bei +25° C und gibt dann den Ansatz auf eine Sephadex-G-50-Säule (10x100 mm), die mit m/50 Na-Citratpuffer p_H 5,5, m/10 NaF und 1% Rinderalbumin äquilibriert worden war. Mit aqua bidest. wird eluiert bei einer Tropfgeschwindigkeit von 0,3 ml/Min. Die Eluate nach der Säule enthielten:

ml Eluat	Glutaminsynthetase		Radioaktivität	
	Einheiten/ml	μ m/mlx10 ²	Ipm/ml x10 ⁻²	μ mATP/ml x10 ⁻²
2,5 - 2,7	153	2,9	61,6	2,8
2,9 - 3,1	241	4,5	96	4,4
3,3 - 3,5	197 --- 225	3,7---4,4	95	4,3
3,7 - 3,9	114 --- 137	2,2---2,7	61	2,7
4,1 - 4,3	63 --- 76	1,2---1,5	53	2,4
4,5 - 4,7	-	-	33	1,5
4,7 - 4,9	-	-	18	0,8
4,9 - 5,4	-	-	143	6,5

Die Werte der gefundenen EE und der daraus berechneten μ m/ml der Fraktionen 3 - 5 wurden korrigiert, da in der Zeit, in der die Eluate trotz schnellstem Arbeiten bis zur jeweiligen Bestimmung der EE durch den optischen Test bei +4° C aufbewahrt werden mußten, die Enzymaktivität abnahm. Für die Korrektur wurde die Abnahme der EE/Zeit, die wir für die Fraktion 1 ermittelt hatten, zugrunde gelegt.

$$K_{II} \frac{1}{10} \div \frac{2}{1} = 0,7$$

XIII. Isolierung der "aktivierten Glutaminsäure".

Ansatz:

0,4 ml Sephadexfiltrat aus Versuch XI.

3150 Ipm, 70 EE = 0,013 μ m E-ATP

0,1 ml m/50 Citratpuffer p_H 5,5, m/10 Fluorid

0,02 ml m/100 Glutaminsäure 0,2 μ m

5 Minuten bei +25° C inkubieren, dann auf Sephadex-G-50-Säule (10x12 mm) geben, die mit m/50 Na-Citratpuffer p_H 5,5, der m/10 an NaF war und 1% Rinderserumalbumin enthielt, äquilibriert worden war. Eluieren mit aqua bidest.

Die Eluate enthielten:

ml Eluat	Glutaminsynthetase		Radioaktivität	
	EE/ml	μ m/mlx10 ²	Ipm/ml	μ m ATP/mlx10 ²
2,6 - 3,0	4	0,08	-	-
3,0 - 3,4	35,5	0,67	580	0,26
3,4 - 3,8	35,3	0,65	510	0,23
3,8 - 4,2	22,1	0,42	420	0,19
4,2 - 4,6	5	0,13	-	-
5,0 - 5,4	-	-	-	-
5,8 - 6,2	-	-	-	-
6,6 - 7,0	-	-	-	-
7,4 - 7,8	-	-	240	-

Zusammenfassung.

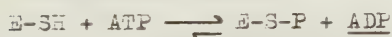
Es werden einige neue Methoden zur Darstellung der Glutaminsynthetase beschrieben, wodurch im Gegensatz zu einer bisherigen 60fachen Reinigung eine 322fache Reinigung des Enzyms erzielt werden konnte. Die spezifische Aktivität steigt dadurch von 34 auf 133.

Durch Behandlung mit Sephadex können aus der Glutaminsynthetase Ammoniumionen quantitativ entfernt werden. Milchsäuredehydrogenase und Pyruvatkinase werden ebenfalls von Ammoniumionen befreit.

Einige Eigenschaften der Glutaminsynthetase werden diskutiert.

Die Gröner von Dr. Wieland et.al. vorgeschlagene Reaktionshypothese über den Mechanismus der enzymatischen Glutaminbildung aus Glutaminsäure, ATP und Ammoniak in Gegenwart der Glutaminsynthetase konnte durch neu angewendete Methoden im folgenden bewiesen werden.

I. In optischen Test kann die Bestimmung des während der Zündreaktion gebildeten ADP sichtbar gemacht werden:



Es entsteht eine der Enzymmenge äquivalente Menge von ADP, und zwar bilden 53 Fermenteinheiten $0,01 \mu\text{m}$ ADP.

Für K_I liess sich ein Wert von ca. 10^3 bestimmen.

II. Mit α -markiertem ATP wird die Bildung von Enzym-ATP nach:



verfolgt. Durch Sephadex G 50 läßt sich die Enzym-ATP-Verbindung isolieren. Durch Vergleich der enzymatischen- und der Radioaktivität ergibt sich auch hier, daß 55 Enzymeinheiten $0,01 \mu\text{m}$ ATP gebunden halten.

Ein zweiter Beweis für Gl. II ist der Einbau von radioaktivem P^{32} in das Enzym in Gegenwart von ATP. Dabei wurde für K_{II} ein Wert von ca 1 ermittelt.

III. Nach:



bildet sich aus E-ATP mit Glutamat unter Abspaltung von radioaktivem ADP enzymgebundene "aktivierete" Glutaminsäure. Sie konnte bei p_H 5,5 über Sephadex isoliert werden. Mit ADP versetzt, ergab sie in Umkehr von Gl. III. nur Glutaminsäure und mit NH_4OH ausschließlich Glutamin nach:



Für K_{III} konnte ein Wert von ca 10^{-1} errechnet werden.

Da $K_I + K_{II} + K_{III} = 10^3$, läßt sich für K_{IV} ein Wert von ca 1 abschätzen.

Mit ATP, dessen γ -Phosphat radioaktiv markiert war, wurde nach der Bildung von E-ATP nach Glutamatzugabe entsprechend Gl. III unmarkiertes ADP abgespalten:



Literaturverzeichnis.

- 1) O.Meyerhof :
Die chemischen Vorgänge im Muskel, Julius Springer
Berlin 1930
- 2) H.A. Krebs, H.L.Kornberg,
Ergeb. Physiologie, Biologie, Chemie u. exp.
Pharmakol. 49, 212 (1957)
- 3) M.B. Hoagland,
Biochim.et biophys.Acta 16, 288 (1955)
- 4) J.A.Demooss, G.D.Novelli,
Biochim.et biophys.Acta 18, 592 (1955)
- 5) P.Berg,
J.of biol.Chem. 222, 1025 (1956)
- 6) M.B. Hoagland, E.B.Keller, P.C.Zamecnik,
J.biol.Chem. 218, 345 (1956)
- 7) M.B.Hoagland, P.C.Zamecnik, M.C.Stephenson,
Biochim.et biophys.Acta 24, 216 (1957)
- 8) M.B.Hoagland, P.C.Zamecnik, N.Sharon, F.Lipmann,
M.P.Stulberg, P.D.Boyer,
Biochim.et biophys.Acta 26, 215 (1957)
- 9) P.D.Boyer, O.J.Koepppe, W.W.Luchsinger, A.B.Falcoone,
Fed.Proc. 14, 185 (1955)
- 10) F.Lipmann, M.E.Jones, S.Black, R.M.Flynn,
J.Am.Chem.Soc. 74, 2384 (1952)
- 11) M.E.Jones, S.Black, R.M.Flynn, F.Lipmann,
Biochim.et biophys.Acta 12, 141 (1943)

- 12) P.Berg,
J.Am.Chem.Soc. 77, 3163 (1955)
- 13) P.Berg,
J.Biol.Chem. 222, 991 (1956)
- 14) P.Berg, G.Newton,
Fed.Proc. 15, 219 (1956)
- 15) P.Berg,
J.biol.Chem. 222, 1015 (1956)
- 16) W.K.Maas, G.D.Novelli,
Arch.Biochem.Biophys. 43, 236 (1953)
- 17) W.K.Maas,
Fed.Proc. 15, 995 (1956)
- 18) W.K.Maas, G.D.Novelli,
Arch.Biochim.Biophys. 71, 311 (1957)
- 19) K.Moldave, A.Meister,
J.biol.Chem. 229, 463 (1957)
- 20) W.P.Jencks, F.Lipmann,
J.biol.Chem. 225, 207 (1957)
- 21) L.H.Lee Peng,
Biochim. et biophys.Acta 22, 42 (1956)
- 22) H.Hilz,
Fed.Proc. 14, 227 (1955)
- 23) P.D.Boyer, O.J.Koepppe, W.W.Luchsinger,
J.Am.Chem.Soc. 78, 356- (1956)
- 24) A.Kowalsky, C.Wyttenbach, L.Langer, D.E.Koshland jr.
J.biol.Chem. 219, 719 (1956)

- 25) M.Cohn,
Biochim.et biophys.Acta 20, 92 (1956)
- 26) S.Kaufman,
J.biol.Chem. 216, 153 (1955)
- 27) K.Bloch,
J.biol.Chem. 179, 1245 (1949)
- 28) J.E.Snoke, K.Bloch,
J.biol.Chem. 199, 407 (1952)
- 29) S.Mandales, K.Bloch,
J.biol.Chem. 214, 639 (1955)
- 30) G.C.Webster, J.F.Varner,
Arch.Biochem.Biophys. 52, 22 (1954)
- 31) G.C.Webster,
Arch.Biochem. Biophys. 47, 240 (1953)
- 32) G.C.Webster, J.E.Varner,
Arch.Biochem.Biophys. 55, 95 (1955)
- 33) J.E.Snoke, S.Yanari, K.Bloch,
J.biol.Chem. 201, 573 (1953)
- 34) J.E.Snoke,
J.biol.Chem. 213, 813 (1955)
- 35) J.E.Snoke, K.Bloch,
J.biol.Chem. 213, 825 (1955)
- 36) H.A.Krebs,
Biochem. J. 29, 1951 (1935)
- 37) J.F.Speck,
J.biol.Chem. 168, 403 (1947)
- 38) J.F. Speck,
J.biol.Chem. 179, 1387 und 1405 (1949)

- 39) W.H. Elliott,
Biochem. J. 49, 106 (1951)
- 40) W.H. Elliott,
J. biol. Chem. 201, 661 (1953)
- 41) F. Lipmann, L-C. Tuttle,
J. biol. Chem. 159, 21 (1945)
- 42) G. Denes,
Biochim. et biophys. Acta 15, 296 (1954)
- 43) H. Waelsch, E. Borek, N. Grossowicz, M. Schou,
Fed. Proc. 9, 242, (1950)
- 44) K. Stumpf, W.D. Loomis,
Arch. Biochem. 25, 451 (1950)
- 45) H. Waelsch, P. Owades, E. Borek, N. Grossowicz, M. Schou,
Arch. Biochem. 27, 237 (1950)
- 46) H. Borsook,
Adv. Prot. Chem. 8, 150 (1953)
- 47) N. Grossowicz, E. Wainfan, E. Borek, H. Waelsch,
J. biol. Chem. 187, 111 (1950)
- 48) L. Levintow, A. Meister, G.H. Hageboom, E.L. Kuff,
J. Am. Chem. Soc. 77, 5304 (1955)
- 49) G.C. Webster, J.E. Varner,
J. Am. Chem. Soc. 76, 633 (1954)
- 50) J.E. Varner, G.C. Webster,
Plant. Physiol. 30, 393 (1955)
- 51) L. Levintow, A. Meister,
J. biol. Chem. 209, 265 (1954)
- 52) L. Legintow, A. Meister,
Fed. Proc. 15, 299 (1956)

- 53) F.Leuthardt, M.Staehelin,
Helv.physiol.pharmacol.Acta 11, 61 (1953)
- 54) M.Staehelin, F.Leuthardt,
Helv.Chim.Acta 38, 184 (1955)
- 55) F.B.Straub,
Z.physiol.Chem. 275, 63 (1942)
- 56) P.D.Boyer, O.J.Koepppe, W.W.Luchsinger,
J.Am.Chem.Soc. 78, 356 (1956)
- 57) A.Kowalsky, C.Wyttenbach, L.Langer, D.E.Koshland,
Abstracts 127th Meeting, Am.Chem.Soc., Cincinnati,
Ohio, March, 1955, p.27c.
- 58) P.D.Boyer, H.J.Fromm,
Fed.Proc. 16, 157 (1957)
- 59) P.D.Boyer, R.C.Mills, H.J.Fromm,
Arch.Biochem.Biophys. 81, 249 (1959)
- 60) J.M.Buchanan, S.C.Hartman,
Adv. in Enzym. Vol. 21, 237
- 61) S.C.Hartman, J.M.Buchanan,
J.biol.Chem. 233, 456 (1958)
- 62) P.R.Krishnaswamy, V.Pamiljans, A.Meister,
Fed.Proc. 19, 349 (1960)
- 63) P.R.Krishnaswamy, A.Meister,
J.biol.Chem. 235, PC39 (1960)
- 64) F.Lipman,
J.biol.Chem. 155, 55 (1944)
- 65) J.A.Rose, M.Grünberg-Mannago, S.R.Koreg, S.Ochoa
J.biol.Chem. 211, 737 (1954)

- 66) Th.Wieland, G.Pfleiderer, B.S
Biochem.Zeitschrift 330, 198
- 67) S.Kaufmann
J.biol.Chem. 216, 153 (1955)
- 68) Th.Wieland, R.Lambert,
Ber. 89, 2476 (1956)
- 69) G.Beisenherz, H.J.Boltze, Th.Bücher, R.Czok,
K.H.Garbade, E.Meyer-Arendt und G.Pfleiderer,
Z.f.Naturforsch.Bd.86, Heft 10, 555 (1953)
- 70) T.E.Weichselbaum,
Amer.J.Clin.Path.Techn.Sec. 10, 40(1946)
- 71) B.Sandmann
Dissertation Frankfurt
- 72) Bo Sörbo
Acta Chem.Scand. 15, 1391 (1961)
- 73) D.Keilin, E.F.Hartree,
Proc.roy.Soc. 121, 173 (1936)
- 74) E.Peterson, H.Sober,
J.Am.Chem.Soc. 78, 751 (1956)
- 75) E.Peterson, H.Sober,
J.Am.Chem.Soc. 78, 756 (1956)
- 76) J.A.Russell,
J.biol.Chem. 156, 457 (1944)
- 77) W.Thorn, T.Heimann,
Kurze mitteilung XX.internat.Physiologen-Kongress,
Brüssel (1956)
- 78) K.Muntz, J.Hurwitz,
Arch.Biochem.Biophys. 32, 137 (1951)

- 79) J.Porath, P.Flodin,
Nature 183, 1657 (1959)
- 80) J.Porath,
Biochim. et biophys.Acta 39, 193 (1960)
- 81) R.L.Kislink,
Biochim.et biophys.Acta 40, 531 (1960)
- 82) Protein Biosynthesis,
Academic Press London + New York 1961
- 83) N.O.Kaplan, F.Lipmann,
J.biol.Chem. 174, 37 (1948)
- 84) Methods of Biochem.Analysis I, 298 (1954)
- 85) H.Nielsen,
Acta Chem.Scand. 12, 38 (1958)
- 86) H.Mattenheimer,
Hoppe. Seyler's Zeitschr.f.Physiol.Chem.316, 282(1959)
- 87) A.Meister,
Biochemistry 1 (1962)
- 88) Th.Wieland, G.Pfleiderer,
Angew.Chem. 67, 257 (1955)
- 89) Th.Wieland, G.Pfleiderer,
Angew.Chemie 69, 199 (1957)
- 90) Th.Wieland, G.Pfleiderer, L.Rettig,
Angew.Chem. 70, 341 (1958)
- 91) K.Scholz,
Diplomarbeit Frankfurt/Main 1962
- 92) G.Pfleiderer,
Biochim.et biophys.Acta 47, 389 (1961)

Ich versichere hiermit an Eides statt,
daß ich zur Anfertigung der vorliegen-
den Dissertation keine unerlaubten Hilfs-
mittel und nur die angegebene Literatur
benutzt habe.

Frankfurt am Main, den 1. März 1962

Anneliese Wähliger

Lebenslauf.

Als Tochter des Justizoberinspektors Martin Diener und seiner Ehefrau Emilie, geb. Donner wurde ich, Annelore Dahlinger, am 28. Januar 1934 in Leipzig als zweites von vier Kindern geboren.

Die Volksschule besuchte ich vier Jahre lang in Leipzig und ging anschließend auf die Oberschule in Rawitsch, im damaligen Warthegau. Nach überstandener Flucht zum Kriegsende wurde ich Schülerin der Max Klinger-Oberschule zu Leipzig, die ich von 1945 bis zum Abitur 1952 besuchte.

Im gleichen Jahr begann ich mit dem Biologiestudium an der Universität Leipzig und arbeitete im Rahmen des Berufspraktikums im Institut für Forstwissenschaften Eberswalde und im Phytopathologischen Institut Aschersleben. 1955 wechselte ich zur Alexander von Humboldt-Universität Berlin über, um dort Biochemie zu studieren.

Als Diplomarbeit begann ich bei Herrn Dr. Libbert über ungesättigte Lactone und deren Transport im pflanzlichen Organismus zu arbeiten. Der Abschluß des Studiums an der Humboldt-Universität wurde mir jedoch untersagt, da ich inzwischen meinen Mann Dietrich Dahlinger, der in Westdeutschland lebte, geheiratet hatte.

Meine Dissertation führte ich in der biochemischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt bei Herrn Professor Dr. Pfeleiderer durch. Das Thema lautete: Zum Wirkungsmechanismus der Glutaminsynthetase.

Abkürzungen.

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BTS	Brenztraubensäure
Co-A	Coenzym A
DDTC	Diäthylthiocarbamat
DPN ⁺	oxydiertes Diphosphopyridinnucleotid
DPNH	reduziertes Diphosphopyridinnucleotid
E	Enzym
EE	Fermenteinheiten
GSH	Glutathion
GS-NH ₂	Glutamin
GS	Glutaminsäure
LDH	Milchsäuredehydrogenase
MK	Myokinase
MS	Milchsäure
P	Orthophosphat
PBTs	Phosphoenolbrenztraubensäure
PC	Pyrrolidoncarboxylat
3-PGADH	3-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase
PGK	Phosphoglyceratkinase
PK	Pyruvatkinase
PP	Pyrophosphat
RNS	Ribonucleinsäure
l-RNS/ s-RNS	lösliche Ribonucleinsäure
TCE	Trichloressigsäure
Tris-Puffer	Hydroxymethyl-aminomethan Puffer

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1959 bis Juni 1961 in der Biochemischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchgeführt.

Meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Prof. Dr. Th. Wieland und Herrn Prof. Dr. G. Pfeleiderer danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für wertvolle Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit. Außerdem habe ich für eine materielle Hilfe Herrn Prof. Dr. Pfeleiderer zu danken.

Herrn Prof. Dr. Halbsguth aus dem Institut für Botanik danke ich für sein verständnisvolles Entgegenkommen und das Interesse, das er meiner Arbeit gewidmet hat.

Herrn Dr. Gruber sei ebenfalls an dieser Stelle für die immer sehr hilfsbereite Unterstützung gedankt.

